

Aus dem

Veterinär-Anatomischen Institut
der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

und

dem Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung
der Medizinischen Fakultät der Universität Leipzig

**Untersuchungen zu biochemischen und morphologischen
Veränderungen im Hirn der transgenen Maus Tg2576 mit
 β -Amyloidplaque-Pathologie**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)
durch die Veterinärmedizinische Fakultät
der Universität Leipzig

eingereicht von
Margrit Klingner
aus Wolgast

Leipzig, 2005

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Gotthold Gäbel

Betreuer: Prof. Dr. Reinhard Schliebs
Prof. Dr. Johannes Seeger

Gutachter: Prof. Dr. Reinhard Schliebs, Paul-Flechsig-Institut für
Hirnforschung, Medizinische Fakultät, Universität Leipzig
Prof. Dr. Johannes Seeger, Veterinär-Anatomisches Institut der
Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Leipzig
Prof. Dr. Fritz R. Ungemach Institut für Pharmakologie,
Pharmazie und Toxikologie der Veterinärmedizinischen Fakultät,
Universität Leipzig
Prof. Dr. Gerd Bicker, Institut für Physiologie, Abteilung
Zellbiologie, Tierärztliche Hochschule Hannover

Tag der Verteidigung: 13.12.2004

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
2	LITERATURÜBERSICHT	4
2.1	Die Alzheimersche Erkrankung.....	4
2.1.1	Klinische Leitsymptome und Diagnostik.....	4
2.1.2	Ätiologie und Pathogenese.....	5
2.1.2.1	Amyloid und β -Amyloidplaques.....	6
2.1.2.2	Neuroinflammation	7
2.1.2.3	Neurofibrilläre Degeneration	7
2.1.2.4	Das cholinerge System	8
2.1.2.5	Die Veränderungen des cholinergen Systems bei Morbus Alzheimer.....	9
2.1.2.5.1	Der Einfluss von NGF auf die cholinerge Neurotransmission.....	10
2.1.2.5.2	Der Einfluss von β -Amyloid auf die cholinerge Neurotransmission.....	10
2.1.2.6	Der Einfluss von β -Amyloid auf die nicht cholinerge Neurotransmission.....	11
2.1.2.7	Die Veränderungen im Energiestoffwechsel bei AD.....	12
2.1.2.7.1	Der Glukosemetabolismus	12
2.1.2.7.2	Der Glukosemetabolismus und β -Amyloid.....	13
2.1.2.8	Die Rolle der Hirnkapillaren bei der Alzheimer-Pathologie.....	14
2.1.2.9	Genetische Prädisposition	15
2.1.2.9.1	Die erbliche Form der AD.....	15
2.1.2.9.2	Die sporadische Form der AD.....	16
2.2	Tiermodelle für die Alzheimersche Krankheit.....	18
2.2.1	Natürliche Tiermodelle	18
2.2.2	Pharmakologische Modelle	18
2.2.3	Läsionsmodelle.....	19
2.2.4	Transgene Tiere.....	20
2.2.5	Die transgene Maus Tg2576	21
3	TIERE, MATERIAL UND METHODEN	24
3.1	Tiere.....	24

3.2	Material.....	24
3.3	Methoden.....	25
3.3.1	Rezeptorautoradiografie	25
3.3.1.1	Herstellung von Hirnschnitten für die Rezeptorautoradiografie	25
3.3.1.2	Durchführung der Rezeptorautoradiografie	25
3.3.1.3	Auswertung der Rezeptorautoradiografie	28
3.3.2	Die ¹³¹ I-Pentapeptid-Autoradiografie.....	29
3.3.3	Immunhistochemische Methoden	30
3.3.3.1	Transkardiale Perfusion.....	30
3.3.3.2	Immunhistochemische Markierung.....	30
3.3.3.3	Plauefärbung mit Thioflavin S	32
3.3.3.4	Azetylcholinesterasefärbung	33
3.3.4	Auswertung der Kapillarmarkierung mittels GLUT1-Immunhisto-chemie.....	34
3.3.5	Die <i>in situ</i> Hybridisierung	35
3.3.5.1	Herstellung der Hirnschnitte	35
3.3.5.2	Radioaktive Markierung der Oligonukleotide.....	35
3.3.5.3	Hybridisierung.....	36
3.3.6	Ex-vivo Studien.....	38
3.3.6.1	Schwanzveneninjektion.....	38
3.3.6.2	Darstellung der Azetylcholinesteraseaktivität im Mäusehirn	38
3.4	Statistik.....	38
4	ERGEBNISSE	39
4.1	Die regionale Verteilung der β-Amyloidplaques im Hirn der transgenen Maus Tg2576	39
4.2	Das cholinerge System in Tg2576-Mäusen.....	40
4.2.1	Histochemische Darstellung der Azetylcholinesterase (AChE).....	40
4.2.2	Der vesikuläre Azetylcholintransporter (VACHT).....	41
4.2.3	Der hoch affine Cholintransporter (HACU).....	43
4.2.4	Die <i>in situ</i> Hybridisierung der mRNA für muskarinische Rezeptoren	47
4.2.5	Die nikotinischen Azetylcholinrezeptoren (nAChR)	50
4.2.5.1	Quantifizierung der Radioligandbindung von [³ H]Cytisin	50

4.2.5.2	Immunhistochemischer Nachweis der α_4 -und α_7 -Untereinheit der nikotinischen Azetylcholinrezeptoren in Tg2576-Mäusen	51
4.2.6	Die <i>ex vivo</i> Markierung der AChE mittels [14 C]MP3A	54
4.3	Das adrenerge System in Tg2576.....	55
4.3.1	Die α_1 - Adrenozeptoren	55
4.3.2	Die α_2 - Adrenozeptoren	56
4.3.3	Die β -Adrenozeptoren.....	58
4.4	Der Energiestoffwechsel	61
4.4.1	Der Glukosestoffwechsel	61
4.4.2	Die immunhistochemische Darstellung der Kapillaren in der Nähe der β -Amyloidplaques	63
4.4.3	Der Sulfonylharnstoffrezeptor.....	65
4.5	Markierung der β-Amyloidplaques mit 131I-Pentapeptid.....	66
5	DISKUSSION	67
5.1	Methodische Betrachtungen.....	67
5.2	Die β -Amyloidplaques im Hirn der Tg2576-Maus.....	70
5.3	Die Veränderungen im cholinergen System der Tg2576-Maus	71
5.4	Die Veränderungen im adrenergen System der Tg2576-Maus.....	77
5.5	Untersuchungen zum Energiestoffwechsel der Tg2576-Maus	79
5.6	Ausblick - die transgene Maus Tg2576 als Alzheimermodell	83
6	ZUSAMMENFASSUNG	85
7	SUMMARY	87
8	LITERATURVERZEICHNIS	89
9	ANHANG.....	A

Abkürzungsverzeichnis

ACh	Azetylcholin
AChE	Azetylcholinesterase
AD	Alzheimer Krankheit (Alzheimer's disease)
APP	Amyloidvorläuferprotein (Amyloid Precursor Protein)
ATP	Adenosintriphosphat
A β	beta-Amyloid
bio-	biotinyliert
Cg	zingulärer Kortex
ChAT	Cholinazetyltransferase
CSF	Zerebrospinalflüssigkeit
Cy	Carbozyanin
DAB	3'3-Diaminobenzidin
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DHA	Dihydroalprenolol
DTT	1,4-Dithiothreitol
ENS	Eselnormalserum
FAD	Familiäre Alzheimer Krankheit
GABA	Gammaaminobuttersäure
GFAP	Glia-fibrilläres saures Protein
GLUT	Glukosetransporter
HACU	high affinity choline uptake (hoch affine Cholinaufnahme)
HCh-3	Hemicholinum-3
HEPES	(N-[2Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-Ethanesulfonsäure])
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
Kap.	Kapitel
LRP	low-density lipoprotein receptor-related protein
mAChR	muskarinischer Azetylcholinrezeptor
MRI	Magnetresonanzbildgebung (Magnetic Resonance Imaging)
mRNA	messenger RNA
M1	primärer motorischer Kortex
nAChR	nikotinischer Azetylcholinrezeptor

NGF	Nervenwachstumsfaktor (nerve growth factor)
NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
Pir	piriformer Kortex
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
PET	Positronenemissionstomographie
PFA	Paraformaldehyd
POD	Peroxidase
ROD	relative optische Dichte
RSA	Rinderserumalbumin
sAPP α	sekretorische Form des APP
S _d	Standardfehler des Mittelwertes
SPECT	Einzelphotonemissionscomputertomografie (Single Photon Emission Computed Tomography)
S1	primärer somatosensorischer Kortex
S1BF	primärer somatosensorischer Kortex (barrel field)
TB	Trispuffer
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
VACHT	vesikulärer Azetylcholintransporter
VLDL	very low density lipoprotein
ZNS	Ziegennormalserum
α -	anti-
β A4	39 - 43 Aminosäuren mit β -Faltblattstruktur

1 Einleitung

Mäuse spielen als Tiermodelle in der naturwissenschaftlichen und medizinischen Forschung eine wichtige Rolle. Einst als Heilige verehrt, als dämonische Wesen mit prophetischen Eigenschaften gefürchtet, später als Sendboten von Seuchen des Gottes Apollon Smintheus betrachtet, wurden sie Mitte des 17. Jahrhunderts erstmals zu Forschungszwecken genutzt.

Heute sind sie wegen ihrer geringen Größe, der relativ kurzen Lebenserwartung, einer hohen Reproduktionsrate sowie wegen des bekannten genetischen Hintergrundes und relativ geringer Kosten für Kauf und Haltung mit einem Anteil von 52% aller zu Tierversuchszwecken genutzten Tiere (BMVEL 2003) die häufigste Versuchstierart für die biomedizinische Forschung in Deutschland.

Sie bieten die Möglichkeit, durch gezielte experimentelle Studien am lebenden, komplexen Organismus biochemische und physiologische Grundprozesse zu untersuchen und liefern wertvolle Hinweise zum Ablauf dieser Prozesse bei Tier und Mensch.

Dienten sie lange Zeit fast ausschließlich als Modelle zum besseren Verständnis der normalen physiologischen Abläufe, steht inzwischen die Erforschung pathologischer Vorgänge im Vordergrund. Mäuse werden vor allem für die medizinische Grundlagenforschung genutzt. Sie sind die beliebtesten Versuchstiere für Genetiker und Immunologen. Einiges Aufsehen erregte 1988 die sogenannte „Harvard-Krebsmaus“, als auf sie das erste Patent auf ein Säugetier vergeben wurde. Jedoch ist der Einsatz von Mäusen, genauso wie der aller anderen Versuchstiere in der Wissenschaft, moralisch und wissenschaftlich nicht unumstritten. Gegner von Tierexperimenten betonen die Verschiedenartigkeit von tierischen und menschlichen Organismen und zweifeln die Übertragbarkeit der in Tierversuchen gewonnenen Ergebnisse, z. B. Wirkungs- und Verträglichkeitsstudien für Arzneimittel, auf den Menschen an. Sie argumentieren, dass wissenschaftliche Erkenntnisse, die mithilfe von Tiermodellen gewonnen wurden, teilweise zu dramatischen Fehleinschätzungen über die Gefährlichkeit von Substanzen bzw. Erregern führten und geeignete *in vitro* Studien reproduzierbarer, billiger und schneller durchführbar sind.

Eine Erkrankung mit stark zunehmender Bedeutung in der heutigen Gesellschaft ist die Alzheimersche Erkrankung (AD). Sie ist die häufigste Demenzerkrankung bei älteren Menschen in den westlichen Industriestaaten mit ständig steigender

Prävalenz. Trotz angestrenzter wissenschaftlicher und medizinischer Forschung sind weder Möglichkeiten der klinischen Frühdiagnose sowie der effektiven Therapie etabliert, noch sind Ätiologie und Pathogenese der AD abschließend aufgeklärt. Hinsichtlich der morphologischen Korrelate für diese Erkrankung wird grundsätzlich zwischen β -Amyloidplaques und neurofibrillären Tangles unterschieden, wobei das β -Amyloid ($A\beta$) aus dem Amyloidvorläuferprotein (APP) durch enzymatische Spaltung entsteht. Zahlreiche Mutationen nahe der β -Amyloidsequenz des APP-Moleküls als auch Untersuchungen an transgenen Mäusen nähren die Vermutung, dass APP und β -Amyloid an der Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung beteiligt sind.

Obwohl vielfältige Erkenntnisse über die Krankheit aus der Untersuchung humanen Hirngewebes verstorbener Alzheimerpatienten gewonnen werden können, ist eine Untersuchung nicht in allen Aspekten und manchmal nur unzureichend durchführbar. Ethische Gründe sind dafür genauso verantwortlich wie auch die ungenügende Standardisierung der Testgruppen sowie das Fehlen von geeigneten Kontrollgruppen beim Menschen. Bei chronischen Prozessen wie der AD spielt außerdem die Beobachtung des Krankheitsverlaufs eine wichtige Rolle. Das Hirngewebe verstorbener Patienten lässt jedoch meist nur Rückschlüsse auf den Endpunkt dieser Krankheit zu.

Um diese Defizite auszugleichen, sind geeignete Tiermodelle erforderlich. Eine Vielzahl von Tiermodellen ist in den letzten Jahrzehnten entwickelt worden, jedoch vereint keines alle pathologischen Merkmale sowie kognitiven Defizite des Morbus Alzheimer in sich.

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit einem Tiermodell für diese Erkrankung, der transgenen Mauslinie (Tg2576), welche die humane APP695-Isoform mit der schwedischen Doppelmutation K670N-M671L exprimiert. Diese Tiere weisen im späteren Verlauf ihres Lebens Amyloidablagerungen auf.

Es sollten am genanntem Mausmodell Untersuchungen zur Detektion dieses pathologischen Merkmals der AD, den β -Amyloidplaques, vorgenommen werden. Das Ziel der Arbeit war es, diese transgene Mauslinie weiterhin hinsichtlich ihres Modellcharakters für die Alzheimersche Erkrankung zu beschreiben, und Plaque-assoziierte Marker-moleküle zu identifizieren, die in weiterführenden Untersuchungen als Grundlage genutzt werden können, um die gewonnenen Erkenntnisse später für die Weiterentwicklung der Frühdiagnostik der Alzheimerschen Erkrankung (z. B. einen Nachweis der β -Amyloidablagerungen) verwerten zu können. Dazu wurden

zwei verschiedene Strategien angewandt, nämlich einerseits die Suche nach cholinergen und adrenergen Parametern sowie Parametern des Energiestoffwechsels, die sich möglicherweise auf Grund der Plaqueablagerung verändern. Andererseits sollte zunächst die Möglichkeit einer *ex vivo* Markierung solcher Moleküle getestet werden, von denen eine besondere Affinität zu diesen Ablagerungen bereits bekannt ist.

2 Literaturübersicht

2.1 Die Alzheimersche Erkrankung

Die Alzheimersche Erkrankung ist die häufigste Demenzerkrankung bei älteren Menschen mit ständig steigender Prävalenz, hervorgerufen durch eine immer höhere Lebenserwartung in der Bevölkerung vor allem westlicher Industriestaaten. Im Jahr 2000 litten allein in Deutschland schätzungsweise 650.000 Menschen an der nach ihrem Entdecker Alois Alzheimer (1864-1915) benannten Krankheit. Jährlich kommen etwa 120.000 Neuerkrankungen hinzu (BICKEL 2000).

Diese Erkrankung stellt eine schwerwiegende Beeinträchtigung der geistigen und sozialen Leistungsfähigkeit der Patienten dar, wobei vor allem Gedächtnis, Sprache sowie das Orientierungs-, Denk- und Urteilsvermögen betroffen sind, was die Bewältigung des normalen Alltags der Betroffenen immer schwieriger werden lässt und auf die Pflegebedürftigkeit dieser Personen hinausläuft. Deshalb ist der Aufwand zur Erforschung von Ursache, Pathogenese sowie Diagnostik und Therapie dieser Demenzerkrankung in den letzten zwei Jahrzehnten enorm gestiegen.

2.1.1 Klinische Leitsymptome und Diagnostik

Der Verlauf dieser meist mit Gedächtnisstörungen und psychiatrischen Symptomen beginnenden Erkrankung ist langsam progredient. Haben die Patienten im Anfangsstadium Schwierigkeiten, sich an Namen und neue Informationen zu erinnern, wirken zum Teil desorientiert in fremder Umgebung und verhalten sich inadäquat im sozialen Umfeld, so sind sie im Endstadium stark dement, oft stumm, unkoordiniert in ihren Bewegungen oder sogar bettlägerig und inkontinent (KELLY 2000). Eine Untersuchung über psychiatrische Frühsymptome bei Alzheimerpatienten ergab, dass sozialer Rückzug, im Mittel schon 33 Monate vor der eigentlichen Diagnosestellung beobachtet, als das häufigste Frühsymptom gilt, gefolgt von Depression, Suizidgedanken, Paranoia, Tag-Nacht-Rhythmusstörungen und Angstgefühlen (JOST u. GROSSBERG 1996).

Die Differentialdiagnosen sind vielfältig. Vaskuläre Demenz (Multi-Infarkt-Demenz), Demenz mit Lewy-Körperchen, Frontallappendegeneration, Morbus Pick, Suchtleiden, Stoffwechselstörungen und Hypovitaminosen, infektiöse Erkrankungen, Tumorerkrankungen und Epilepsien, um nur einige zu nennen, müssen von der Alzheimerdemenz unterschieden werden. Die Schwierigkeit besteht darin, dass eine

definitive Diagnosestellung vor allem im Anfangsstadium lediglich durch Hirnbiopsien bzw. post mortem durch Autopsie erreicht werden könnte. Da bis heute noch kein praktikabler Labortest existiert (MEGA 2002), ist die klinische Untersuchung noch immer das wichtigste Instrument zur Diagnosefindung. Sie basiert auf gründlicher Anamnese, klinischer Untersuchung und einer Reihe von neuropsychologischen Tests. Darüber hinaus wird weiter an der Entwicklung anderer geeigneter Tests gearbeitet. So verspricht man sich z. B. mithilfe der MRI (Magnetresonanzbildgebung) das Ausmaß der Hirnatrophie quantifizieren zu können (CLARK u. KARLAWISH 2003). Aussagen über Veränderungen in der zerebralen metabolischen Aktivität und im Blutfluss bei Alzheimerpatienten verspricht man sich durch andere bildgebende Verfahren wie die Einzelphotonemissionscomputertomografie (SPECT) (JAGUST et al. 2001; KURZ et al. 2002) bzw. die Positronenemissionstomografie (PET) (AGDEPPA et al. 2001). Weiterhin werden biochemische Marker in der Zerebrospinalflüssigkeit (CSF) untersucht. Hierzu gehören Mikrotubuli-assoziiertes Tauprotein und β -Amyloid (WILTFANG et al. 2001). Wenige Alzheimerfälle entstehen durch Mutationen in Genen, die für das Amyloidvorläuferprotein (APP) oder die Präseniline (PS1 und -2) kodieren, wobei kommerzielle Tests lediglich für PS1 vorhanden sind (CLARK u. KARLAWISH 2003). Eine Apolipoprotein-E-Genotypisierung für das ϵ 4-Allel, welches als ein weiterer genetischer Risikofaktor für die Entwicklung von AD gilt, ist zwar möglich, jedoch ist sein Vorhandensein kein eindeutiges Diagnosekriterium (PRICE et al. 1998).

2.1.2 Ätiologie und Pathogenese

Die klinischen Symptome der Alzheimerschen Krankheit werden durch molekulare Veränderungen und zelluläre Funktionsstörungen im Gehirn hervorgerufen, deren Ursachen bisher nur in Ansätzen verstanden werden.

Ganz allgemein werden zwei grundsätzliche neuropathologische Merkmale unterschieden: extrazelluläre β -Amyloidablagerungen und neurofibrilläre Tanglebildung in Neuriten und neuronalen Perikarya (BRAAK u. BRAAK 1997). Dies geht einher mit aktivierten Mikroglia und reaktiven Astrozyten (GIULIAN et al. 1995, MCGEER et al. 2000) sowie Synapsenverlust und Neurondegeneration, inklusive Hirnatrophie (BAUER 1994).

2.1.2.1 Amyloid und β -Amyloidplaques

Amyloidplaques sind im wesentlichen im Kortex diffus verteilte, 5-200 μm große Ablagerungen, bestehend aus fibrillär aggregierten, 39 bis 43 Aminosäuren langen Proteinen mit β -Faltblattstruktur (βA4), die in unterschiedlicher Gestalt im Hirn auftreten können. Obwohl auch bei nicht dementen älteren Individuen nachweisbar, sind solche Plaqueablagerungen eine notwendige, wenn auch wahrscheinlich keine hinreichende Bedingung für die Entwicklung einer AD. Man unterscheidet diffuse, primitive, klassische und kompakte Plaques, wobei die diffusen Plaqueablagerungen die initiale Phase darstellen. Sie bestehen aus wolkenartigen Einlagerungen gelöster, nicht präzipitierter Substanzen und zeigen kaum reaktive Gliazellen, oder neurodegenerative Veränderungen. Sie repräsentieren zwischen 25% und 50% aller im Kortex vorhandenen Plaques (BAUER 1994), enthalten nur wenig βA4 , dafür vor allem APP und lassen sich nur mit Antikörpern gegen β -Amyloid, nicht aber mittels Kongo Rot oder Thioflavin S anfärben. Die Anfärbbarkeit durch diese Farbstoffe ist ein gemeinsames Merkmal der drei anderen genannten Plaquestadien. Grund dafür ist, dass hier das βA4 in der charakteristischen β -Faltblattstruktur aggregiert ist. Zusätzlich bewirken die drei letztgenannten Plaquestadien eine Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten, sowie die Schädigung von Nervenzellstrukturen. Unterschiede zwischen primitiven, klassischen und kompakten Plaques bestehen in ihrer Lage zu Blutgefäßen und der Ausbildung von "Amyloidkernen", einer kompakten Kongo Rot- und Thioflavin S-positiven Ablagerung. Während die primitiven Plaques weder mit Kapillaren assoziiert sind, noch Amyloidkerne besitzen, weisen die klassischen und kompakten Plaques beides auf, wobei das Gefäß innerhalb, wie bei den klassischen oder außerhalb, wie bei den kompakten Plaques, liegen kann (BAUER 1994).

Die βA4 -Fragmente entstehen durch Spaltung des Amyloidvorläuferproteins (APP) mittels β - und γ -Sekretase. APP ist ein 110 bis 130 kDa großes und ca. 770 Aminosäuren langes Transmembranglykoprotein, das im Hirn von Neuronen, Astrozyten und Mikroglia synthetisiert wird (BAUER 1994) und dessen Gen beim Menschen auf Chromosom 21 lokalisiert ist. Seine physiologischen Funktionen sind noch immer ungeklärt. Vermutet wird jedoch aufgrund der Abundanz dieses Proteins, dass es wichtige biologische Funktionen bei der Aufrechterhaltung von neuronalen Strukturen und des synaptischen Spaltes hat (SAITOH u. MOOK-JUNG 1999). Als Endprodukte entstehen β -Amyloidpeptide, entweder das kürzere $\text{A}\beta_{40}$ (bestehend

aus 40 Aminosäuren) oder das längere $A\beta_{42(43)}$ (42 bzw. 43 Aminosäuren), wobei in frühen Stadien der Amyloidablagerungen fast ausschließlich $A\beta_{42(43)}$ vorkommt (JARRETT et al. 1993). Herrschte lange Zeit die Meinung vor, dass $A\beta$ seine neurotoxische Wirkung nur entfalten kann, wenn es fibrillär aggregiert vorliegt (PIKE et al. 1993), so gibt es neuerdings Hinweise darauf, dass die eigentlichen Toxizitätsinduktoren auch die Protofibrillen sein könnten (HARTLEY et al. 1999; ZHU et al. 2000). Erfolgt die APP-Spaltung jedoch durch die α -Sekretase, entsteht die sekretorische Form des APP ($sAPP\alpha$), das gemeinsam mit dem APP vermutlich vielfältige, zum Teil neuroprotektive Funktionen erfüllt wie z. B. Neuritenwachstumsregulation, Synaptogenese, Zelladhäsion und Proteaseinhibition (MATTSON 1997).

2.1.2.2 Neuroinflammation

Die Beobachtung, dass senile Plaques in Alzheimergehirnen von reaktiven Astrozyten und aktivierter Mikroglia umgeben sind, und Hinweise, dass eine antiinflammatorische Behandlung von Alzheimerpatienten die Symptome der Krankheit mildern kann, legte die Vermutung nahe, dass auch entzündliche Komponenten als relevant für die Pathogenese dieser Erkrankung anzusehen sind, wenn ihre Aktivierung unkontrolliert erfolgt. Zahlreiche Untersuchungen zeigten z. B. die Hochregulierung von Akute-Phase-Proteinen, Prostaglandinen, Zytokinen und Chemokinen sowie deren Rezeptoren bei Alzheimerpatienten (AKIYAMA et al. 2000) und die Aktivierung der Komplementkaskade durch β -Amyloid (JIANG et al. 1994; WEBSTER et al. 1997).

2.1.2.3 Neurofibrilläre Degeneration

Merkmale der neurofibrillären Degeneration sind neurofibrilläre Tangles (NFT) in Zellen und proximalen Dendriten sowie die sogenannten "neuropil threads" (degenerativ veränderte Nervenfasern außerhalb von Plaques) und dystrophische Neuriten (neuronalen Fortsätze, vor allem distale Axone, die Filamente enthalten) (PRICE et al. 1998). Bei diesen Strukturen handelt es sich um hyperphosphorylierte Mikrotubuli-assoziierte Proteine (vor allem Tauprotein), die paarweise helikal verdreht sind und deshalb als „paired helical filaments“ bezeichnet werden. Physiologisch sind Tauproteine an der Mikrotubuli-Stabilisierung und Transportprozessen innerhalb der Zelle beteiligt (BAUER 1994).

Letztendlich gehen NFT-tragende Nervenzellen, möglicherweise durch Apoptose, zugrunde.

Bei Alzheimerpatienten korreliert die Dichte der NFT mit der Schwere der Demenz, obwohl auch in Hirnen von älteren nicht dementen Personen solche Ablagerungen beobachtet worden sind. NFT bilden sich aber auch aufgrund einer Vielzahl anderer degenerativer, toxischer oder traumatischer Einwirkungen im Gehirn (BURNETT 2000).

2.1.2.4 Das cholinerge System

Das cholinerge System des basalen Vorderhirns besteht aus den cholinergen Neuronen des Nucleus basalis Meynert, des horizontalen und vertikalen Diagonalbandes von Broca und des medialen Septumkernes (WENK et al. 1980; MESULAM 1996). Von hier aus werden Projektionen in das limbische System und in kortikale Regionen gesandt, wobei Neuronen, die im medialen Septum liegen, überwiegend in den Hippokampus projizieren, während aus dem Diagonalband von Broca Afferenzen zum zingulären Kortex und zum Riechzentrum, aber zum kleinen Teil auch zum Hippokampus führen. Der Nucleus basalis Meynert versorgt die Amygdala sowie alle anderen kortikalen Regionen mit cholinergem Innervation (AULD et al. 2002). Die Erregungsübertragung im cholinergen System erfolgt durch den Neurotransmitter Azetylcholin. Er wird aus Cholin und Azetyl-Koenzym A durch das Enzym Cholinazetyltransferase in der Präsynapse gebildet und dort in Vesikel, vermittelt durch den vesikulären Azetylcholintransporter (VACHT), überführt und gespeichert. Bei exzitatorischen Potentialen wird ACh an der Membran in den synaptischen Spalt ausgeschüttet und an Azetylcholinrezeptoren (AChR) der Postsynapse gebunden. Das ACh im synaptischen Spalt wird durch das Enzym Azetylcholinesterase (AChE) hydrolysiert, wobei das entstehende Cholin durch hoch affine, Natrium-abhängige Cholintransporter (high affinity choline uptake; HACU) wieder in die Präsynapse aufgenommen wird (LOCKMAN u. ALLEN 2002). Die Azetylcholinrezeptoren werden in zwei große Gruppen unterteilt: nikotinische und muskarinische AChR.

Die nikotinischen ACh-Rezeptoren gehören der Familie der Ligand-gesteuerten Ionenkanäle an. Sie sind Heterooligomere, bestehend aus fünf Untereinheiten, jede wiederum bestehend aus vier Transmembrandomänen (LE NOVERE u. CHANGEUX 1995), wobei die Schleife zwischen dritter und vierter Transmembrandomäne die größte darstellt. Bisher sind wenigstens elf neuronale Untereinheiten bekannt (α_{2-9} und β_{2-4}) (SCHRÖDER u. WEVERS, 1998). Im Neokortex kommt vor allem der $\alpha_4\beta_2$ -

Subtyp vor, wohingegen im Hippokampus hauptsächlich der α_7 -Subtyp vorhanden ist (SPARKS et al. 1998; KAWAI et al. 2002). Ihre Funktion erstreckt sich sowohl auf die Vermittlung schneller synaptischer Transmissionen als auch auf die Modulation des glutamatergen und GABAergen Neurotransmissionssystems. Dem α_7 nAChR werden neben trophischen Eigenschaften (ROLE u. BERG 1996) auch neuroprotektive Mechanismen, z. B. gegen A β -Zytotoxizität zugeschrieben (SHIMOHAMA u. KIHARA 2001).

Die muskarinischen ACh-Rezeptoren gehören zur Familie der G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Man unterscheidet fünf verschiedene Rezeptorsubtypen (M₁ bis M₅). Sie alle besitzen sieben Transmembrandomänen, wobei die Unterschiede am extrazellulären N-Terminus, sowie hauptsächlich an der dritten, intrazellulären Schleife nachgewiesen wurden (CAULFIELD u. BIRDSALL 1998). M₁, M₃ und M₅ binden an G_q-Proteine, wodurch über die Aktivierung der Phospholipase C einerseits Inositoltriphosphat-vermittelt Kalzium ausgeschüttet wird und andererseits Diacylglycerol-vermittelt die Proteinkinase C aktiviert wird, die in Gegenwart von Kalzium Proteine phosphoryliert. Eine Stimulation der postsynaptischen muskarinischen M₁- und M₃-Rezeptoren führt zu neuronaler Exzitation, wobei dies auch indirekt durch Verstärkung der Antwort auf ein exzitatorisches Potential geschehen kann und als Neuromodulation bezeichnet wird. Die muskarinischen M₂- und M₄-Azetylcholinrezeptoren inhibieren durch Aktivierung von G_i-Proteinen die Adenylatzyklase, wodurch z. B. die Transmitterfreisetzung am synaptischen Spalt gehemmt wird.

2.1.2.5 Die Veränderungen des cholinergen Systems bei Morbus Alzheimer

Durch die im Verlauf der Krankheit frühzeitige Degeneration cholinerg Neurone im basalen Vorderhirn kommt es zur Beeinträchtigung bzw. zum Verlust cholinerg kortikaler Afferenzen (WHITEHOUSE et al. 1982; COYLE 1983; ARENDT u. BIGL 1987). Die Synthese und der Gehalt von Azetylcholin (SIMS et al. 1980; RICHTER et al. 1980) und Cholinazetyltransferase (ChAT) (BIERER et al. 1995; BISSETTE et al. 1996) sowie die Dichte von nikotinischen ACh-Rezeptoren (nAChR) im Kortex verringert sich (SABBAGH et al. 1998; SIHVER 1999). Die Veränderungen im muskarinischen Rezeptorsystem werden uneinheitlich beurteilt, meist wird von einer Erhöhung oder keiner Veränderung berichtet. MULUGETA et al. (2003) fanden eine Reduzierung von M₄-Rezeptoren in einer Region des Hippokampus von

Alzheimerpatienten. Diese Defizite korrelieren positiv mit kognitiven Beeinträchtigungen sowie mit nichtkognitiven Verhaltensstörungen von AD-Patienten (NORDBERG et al. 1995; AULD 2002).

Die Beobachtung, dass der beträchtliche Verlust cholinergischer Funktionen im Gehirn die Lern- und Gedächtnisdefizite bei Alzheimerpatienten wenigstens teilweise bedingt, führte zur Formulierung der cholinergen Hypothese der geriatrischen Gedächtnisstörung (COYLE et al. 1983). Dies führte auch zur Entwicklung der einzigen bisher etablierten, wenn auch palliativen, Therapie, welche in der Applikation von Azetylcholinesteraseinhibitoren besteht.

2.1.2.5.1 Der Einfluss von NGF auf die cholinerge Neurotransmission

Folglich ergab sich die Frage nach den Ursachen der hohen Vulnerabilität von cholinergen Neuronen. Es wurde z. B. angenommen, dass sich durch verminderte ACh-Gehalte die Zellmembranzusammensetzung verändert, woraus eine erhöhte abnormale APP-Prozessierung resultieren könnte (WURTMAN 1992). Möglich ist auch, dass der Nervenwachstumsfaktor (NGF) eine wichtige Rolle spielt. Er trägt zur Entwicklung und Funktion des cholinergen Systems des basalen Vorderhirns bei, indem er die ChAT-Aktivität, die ACh-Freisetzung und die Somatagröße beeinflusst (AULD et al. 2002). Cholinerge Zellen und ihre Terminalen tragen verschiedene NGF-Rezeptoren. Durch Bindung von NGF an diese Rezeptoren wird eine intrazelluläre Kinase-Kaskade aktiviert, wobei ein Substrat dieser Kinasen auch das Tauprotein ist. Dieser Mechanismus könnte die Empfindlichkeit solcher cholinergischer Neurone im basalen Vorderhirn gegenüber Hyperphosphorylierung von Tauprotein mit nachfolgender Tanglebildung erklären (ROSSNER et al. 1998). Auch ein Einfluss von NGF auf bestimmte Lern- und Gedächtnisfunktionen bei Ratten wurde beschrieben (GUTIERREZ et al. 1997; WOOLF et al. 2001). Bei Alzheimerpatienten sind die NGF-Proteinkonzentrationen in Kortex und Hippokampus normal oder erhöht, während dieselben im basalen Vorderhirn verringert sind (SIEGEL u. CHAUHAN 2000), was darauf hinweist, dass die Aufnahme oder der retrograde Transport des NGF gestört sein kann.

2.1.2.5.2 Der Einfluss von β -Amyloid auf die cholinerge Neurotransmission

Eine wichtige Funktion bei der erhöhten Vulnerabilität der cholinergischen Neuronen scheint auch das A β einzunehmen. Es wird angenommen, dass die neuromodulatorischen Effekte von A β auf die cholinergischen Funktionen und seine chronischen

Effekte zur cholinergen Hypofunktion beitragen. Seine toxischen Effekte auf Neuronen wurden hinreichend beschrieben (YANKNER et al. 1989; PIKE et al. 1993; HARTLEY et al. 1999), aber auch heftig bestritten (JOSEPH et al. 2001; TURNBULL et al. 2001).

KAR et al. (1996) zeigten, dass nicht toxische Konzentrationen von β -Amyloidpeptiden die Kalium-gesteuerte ACh-Freisetzung in Rattenhirnschnitten hemmen. Es wurden auch eine $A\beta_{42}$ -vermittelte Erniedrigung der intrazellulären ACh-Synthese und eine Aktivitätsverminderung der Pyruvatdehydrogenase in Neuronenkulturen festgestellt, wodurch die Versorgung mit Azetyl-Koenzym A, einem Ausgangssubstrat des ACh, eingeschränkt wird (HOSHI et al. 1997). Hoch affine Cholintransporter, deren Aktivität möglicherweise auch durch $A\beta$ beeinflusst wird (KRISTOFIKOVA et al. 2001), sind verantwortlich, dass das Cholin in die Zelle transportiert und zu ACh umgewandelt werden kann. Durch die Verringerung von ACh im Hirn verschiebt sich das Gleichgewicht zwischen der sAPP α - und $A\beta$ -Entstehung zugunsten von $A\beta$, was die β -Amyloidplaqueentstehung begünstigt. Kürzlich zeigten WANG et al. (2000), dass $A\beta_{42}$ an die α_7 -Untereinheit der nAChR bindet. Von PETTIT et al. (2001) wurde der Nachweis erbracht, dass $A\beta_{42}$ die durch nAChR vermittelte Spannung blockiert und die Wahrscheinlichkeit für offene Kanäle verringert. Bei post mortem Untersuchungen von Alzheimergehirnen sind nur geringe Veränderungen muskarinerger Rezeptoren beobachtet worden. Es gibt aber auch Hinweise auf negative Effekte von $A\beta$ auf die Muskarinrezeptor-gekoppelte Aktivierung von G-Proteinen (KELLY et al. 1996).

$A\beta$ kann die cholinergen Funktionen beeinträchtigen, vermutlich durch Reduktion der Synthese cholinergischer Markerenzyme. Eine einheitliche Hypothese der Alzheimer-Pathophysiologie muss die neurotoxischen Effekte des $A\beta$ zusammen mit der entdifferenzierenden Wirkung dieser Peptide auf die cholinergen Eigenschaften betrachten (BLUSZTAJN u. BERSE 2000).

2.1.2.6 Der Einfluss von β -Amyloid auf die nicht cholinerge Neurotransmission

Post mortem Untersuchungen ergaben, dass neben dem cholinergen System auch verschiedene andere Neurotransmittersysteme von starken Veränderungen im Verlauf der Erkrankung betroffen sind. Inzwischen gibt es Hinweise auf Beeinträchtigungen des glutamatergen, serotoninerger, noradrenerger, histaminerger und GABA-erger Systeme. So konnten in post mortem Material

signifikant verringerte Noradrenalin- und Serotoninkonzentrationen sowie NMDA-Rezeptorbindung in verschiedenen Kortex- und Hippokampusregionen bei Alzheimerpatienten im Vergleich zu Kontrollen festgestellt werden, während die histaminergen Defizite nicht so deutlich ausgeprägt, wohl aber vorhanden waren (GREENAMYRE et al. 1987; REINIKAINEN et al. 1988; SCHNEIDER et al. 1997).

Obgleich sich viele Untersuchungen mit dem Einfluss von A β auf die cholinerge Neurotransmission beschäftigen, ist unbestritten, dass auch andere Transmittersysteme durch dieses Peptid moduliert werden. So konnte beispielsweise durch LI und SMITH (1996) eine durch A β verursachte Reduktion der Noradrenalin-freisetzung in Rattenhirnschnitten beschrieben werden. Eine Verringerung der Glutamataufnahme durch A β -Einwirkung wird von verschiedenen Gruppen beschrieben (HARRIS et al. 1995; PARPURA-GILL et al. 1997). Dieser Effekt wird mit der A β -induzierten Bildung freier Radikale in Zusammenhang gebracht. Nach Injektion von A β in den Nucleus basalis Meynert, fanden SCALI et al. (1999) eine erhöhte Freisetzung von GABA im Hippokampus.

Diese Messwerte, gemeinsam mit den Effekten auf das cholinerge System, weisen auf die enorme Komplexität der durch β -Amyloid verursachten Veränderungen im Gehirn hin.

2.1.2.7 Die Veränderungen im Energiestoffwechsel bei AD

2.1.2.7.1 Der Glukosemetabolismus

Glukose ist der zentrale und weitgehend einzige Energielieferant für alle metabolischen Vorgänge im Gehirn, der mithilfe von Glukosetransportern über die sonst relativ undurchlässige Blut-Hirn-Schranke in das Gehirn gelangt. Durch die Glykolyse wird Azetyl-Koenzym A gebildet, das als Ausgangsmolekül sowohl für die Entstehung des energiereichen Substrats Adenosintriphosphat (ATP) als auch für die Bildung von ACh als cholinergem Neurotransmitter und Cholesterol als wichtigem Zellmembranbestandteil und Basiskomponente der Neurosteroiden gilt (HOYER 2000). Reguliert wird die Glukoseaufnahme durch die Zelle unter anderem durch das Hormon Insulin, welches auch im Hirn gebildet wird; die Insulinrezeptoren sind weit verbreitet auf kortikalen und hippokampalen Neuronen (HOYER 2000).

Bei Alzheimerpatienten wurden vielfältige Störungen des Glukosestoffwechsels beobachtet. So wurden veränderte Aktivitäten von glykolytischen Enzymen, verringerte Dichten der kortikalen Glukosetransporter (GLUT) GLUT1 und GLUT3,

Störungen bei der Insulin-Signaltransduktion, sowie mithilfe von PET-Untersuchungen eine Reduktion der [^{18}F]Desoxyglukose-Aufnahme festgestellt (VANNUCCI et al. 1997). Obwohl die Insulinkonzentration im Hirn bei an AD Erkrankten unverändert war, konnten FRÖLICH et al. (1998) eine Erhöhung der Insulinrezeptoren feststellen. Auf diese Arbeit sowie auf eigene weiterführende Untersuchungen stützt sich die von HOYER (1998) vertretene Hypothese, dass die sporadische Form der Alzheimerschen Krankheit die Form eines auf das Gehirn beschränkten Diabetes mellitus, Typ II sein könnte. Weiterhin kommt es durch den beeinträchtigten Glukosemetabolismus zu einer verringerten Produktion des Azetyl-Koenzyms A, um das drei verschiedene Stoffwechselwege als Ausgangsstoff konkurrieren. Es resultiert daraus eine verringerte Energieversorgung und Bereitstellung von ACh, dem Neurotransmitter, der eine wichtige Rolle bei Lern- und Gedächtnisprozessen spielt (DRACHMAN u. LEAVITT 1974). BROWNE et al. (2001) bewiesen im Tierexperiment, dass eine selektive Läsion des cholinergen Systems auch zu Glukosehypometabolismus führt.

2.1.2.7.2 Der Glukosemetabolismus und β -Amyloid

Ein Glukosehypometabolismus und der daraus resultierende Energiemangel im Gehirn wirkt sich auch auf die Prozessierung von APP aus. So prozessieren Zellen, deren oxidativer Energiemetabolismus gehemmt wird, potenzielle amyloidogene Derivate aus APP, die im Golgi-Apparat abgelagert werden (GABUZDA et al. 1994). Solche Auswirkungen auf die nicht amyloidogene sekretorische APP-Verstoffwechselung wurden auch von GASPARINI et al. (1997) untersucht. In COS-Zellen sank die Produktion von APPs unter Glukosemangel, was wiederum die Vulnerabilität der Neuronen gegenüber metabolischen oder anderen Noxen erhöhte. Umgekehrt können sich auch erhöhte APP-Konzentrationen sowie dessen Spaltprodukte negativ auf den Glukosestoffwechsel auswirken. In transgenen Mäusen, die das humane APP überexprimieren, wurde beispielsweise eine Verringerung des zerebralen Glukosestoffwechsels festgestellt (HSIAO et al. 1995). Eine Ursache dafür könnte in der Konkurrenz von A β und Insulin um die Insulinrezeptoren liegen (XIE et al. 2002), wodurch die Hypothese von HOYER (1998), dass es sich bei der Alzheimerschen Erkrankung um eine Form von Insulinresistenz handelt, bestätigt würde. Ein weiterer Zusammenhang zwischen A β und Insulin ergibt sich aus Untersuchungen von KUROCHKIN u. GOTO (1994) sowie

FARRIS et al. (2003). Danach ist das Insulin-degradierende Enzym auch am Abbau der β -Amyloidproteine beteiligt.

2.1.2.8 Die Rolle der Hirnkapillaren bei der Alzheimer-Pathologie

Die Rolle, die Störungen in der Blutversorgung bzw. vaskuläre Anomalien bei der Entstehung der Alzheimerschen Erkrankung spielen, ist noch nicht eindeutig geklärt. Die Blutgefäße und Kapillaren in solchen Hirnen weisen deutliche Veränderungen auf. So wurden Basalmembranverdickungen, Verkleinerung des Kapillarlumens, Atrophie sowie Schwellung von Endothelzellen und Perizyten und degenerative Veränderungen der glatten Muskulatur der Blutgefäße beobachtet (MIYAKAWA et al. 1988). Von manchen Autoren wird die Meinung vertreten, die Krankheit sei ursächlich eine eher durch vaskuläre Störungen als durch Neurodegeneration hervorgerufene (DE LA TORRE 2002) und die kognitiven Symptome seien lediglich Folgen der vaskulären Funktionsstörungen. Einigkeit herrscht auch noch nicht über die Herkunft des im Hirn akkumulierten β -Amyloids (ZLOKOVIC 2002). Hier stehen sich die neuronale und die vaskuläre Theorie gegenüber. Während sich erstere auf die erhöhte β -Amyloidbildung in Neuronen stützt, beruht letztere auf der Beobachtung, dass das Amyloid auch in den Kapillarwänden von Alzheimerhirnen abgelagert wird (sogenannte kongophile Angiopathie) und dass Amyloidplaques häufig mit Kapillaren assoziiert sind (KAWAI et al. 1990).

Bisher scheint sicher zu sein, dass es durch die Krankheit zu einer Reduktion des zerebralen kortikalen Blutflusses kommt (NEBU et al. 2001; TONINI et al. 2003), und dass es eine positive Korrelation zwischen der Abnahme dieses zerebralen Blutflusses und den kognitiven Störungen der Patienten gibt (USHIJIMA et al. 2002). Wodurch diese Reduktion hervorgerufen wird, kann bisher nur vermutet werden. Eine Beteiligung des Neurotransmitters ACh an der Regulation des Blutflusses wird vermutet, da die Applikation von Scopolamin, einem kompetitiven Blocker muskarinischer Rezeptoren, den Blutfluss im frontalen Kortex senkt (HONER 1988) und AChE-Hemmer zu einer Erhöhung des Blutflusses führen (BRAIDA u. SALA 2001). Eine wichtige regulative Rolle hinsichtlich des Blutflusses besitzen auch die cholinergen Neurone im basalen Vorderhirn. Durch die Stimulation des Nucleus basalis Meynert bei Ratten wurde eine Vasodilatation und ein erhöhter kortikaler Blutfluss erzielt, wobei sich dieser Effekt durch muskarinische und nikotinische Rezeptorblocker antagonisieren ließ (BIESOLD et al. 1989). Möglich ist auch, dass

es durch die Lumenverkleinerung der Kapillaren zu einer Hypoperfusion des Hirns kommt, die verschiedene metabolische Veränderungen nach sich zieht. Nachgewiesen sind eine verringerte metabolische Glukose- und Sauerstoffrate sowie ein geringerer Glukoseverbrauch im zerebralen Kortex und Hippokampus (YAMAGUCHI et al. 1997; TOHGI et al. 1998; HOYER et al. 1991). Nach bilateraler chronischer Okklusion der beiden Arteriae carotidiae bei Ratten konnten kapilläre Veränderungen beobachtet werden, die denen in Alzheimerhirnen glichen. Auch zahlreiche metabolische Parameter wiesen auf den Hypometabolismus hin, wie z. B. eine geringere postsynaptische cholinerge Aktivität, eine Abnahme des Glukoseverbrauchs und eine Verminderung der hippokampalen Zytochromoxidase als Marker für den Energiemetabolismus (DE LA TORRE 2002).

2.1.2.9 Genetische Prädisposition

Neben der häufigeren sporadischen Form der AD entstehen ca. 5% der Alzheimerfälle durch autosomal dominante Mutationen. Aber auch die sporadischen Formen können teilweise genetische Ursachen haben.

2.1.2.9.1 Die erbliche Form der AD

Bei der auch als Familiäre Alzheimersche Krankheit (FAD) bezeichneten Form treten die Symptome vor dem 65. Lebensjahr auf. Bisher wurden Veränderungen auf den Chromosomen 21, 14 und 1 als Ursachen identifiziert, wobei lediglich 30-50% aller FAD-Betroffenen mit diesen Mutationen in Verbindung gebracht werden können (BURNETT 2000).

Die ersten Mutationen, die hinsichtlich der FAD beschrieben wurden, betreffen ein Gen auf Chromosom 21, das für das APP kodiert. Zahlreiche Mutationen wurden bereits mit entsprechenden *in vivo* und *in vitro* Effekten beschrieben (Tab. 2.1). Eine gemeinsame Eigenschaft aller dieser Mutationen ist eine erhöhte A β -Protofibrillenproduktion, die im weiteren Verlauf zur Aggregation von β -Amyloidplaques führt.

Eine andere Genfamilie, deren Mutationen FAD hervorruft, sind die Präseniline (PS), Transmembranproteine mit acht Transmembrandomänen, wobei zwei Formen unterschieden werden. PS-1, das gemeinsam mit Nicastrin, APH-1 und PEN-2 die γ -Sekretasespaltung des APP katalysiert (MATTSON 2003), ist lokalisiert auf Chromosom 14 und wohl verantwortlich für die Mehrheit der FAD-Fälle (BURNETT 2000). PS-2 ist lokalisiert auf Chromosom 1; Mutationen sind hier deutlich seltener.

Die Funktion der Präseniline bleibt noch aufzuklären, bisher wird angenommen, dass sie z. B. eine Rolle bei intrazellulären Transportmechanismen spielen (WASCO 2001). Mutationen in beiden Genen scheinen die γ -Sekretaseaktivität zu beeinflussen und die Generierung von $A\beta_{42(43)}$ Peptiden zu erhöhen (HUTTON u. HARDY 1997; LEWIS et al. 2000a).

Codon	genannt	Effekte <i>in vivo/in vitro</i>	beschrieben durch
K670N M671L	schwedische Mutation	erhöhte $A\beta$ Produktion	MULLAN et al. 1992
A692G	flämische Mutation	zerebrale $A\beta$ Angiopathie, alternative $A\beta$ N-Termini	HENDRIKS et al. 1992
E693Q	niederländische Mutation	zerebrale $A\beta$ Angiopathie, erhöhte $A\beta_{42}$ Fibrillogenese, Neurotoxizität	MURAKAMI et al. 2002
E693K	Italienische Mutation	erhöhte $A\beta_{42}$ Fibrillogenese, Neurotoxizität	MURAKAMI et al. 2002
E693G	Arktische Mutation	erhöhte $A\beta$ Protofibrillen- formation, Neurotoxizität	MURAKAMI et al. 2002 NILSBERTH et al. 2001
D694N	Iowa-Mutation	zerebrale $A\beta$ Angiopathie, erhöhte $A\beta_{42}$ Fibrillogenese	MURAKAMI et al. 2002
I716V	Florida-Mutation	Änderung der γ -Sekretase Schnittstelle im APP-Molekül, erhöhte $A\beta_{42}$ Produktion	ECKMAN et al. 1997
V717I V717F V717G	Londoner Mutationen	erhöhte $A\beta_{42}$ Produktion	NARUSE et al. 1991 MURRELL et al. 1991 CHARTIER-HARLIN et al. 1991

Tab. 2.1: Bekannte genetische Mutationen bei Alzheimerpatienten

2.1.2.9.2 Die sporadische Form der AD

Die Ursache der in der Regel nach dem 65. Lebensjahr auftretenden sporadischen Form der Alzheimerschen Erkrankung ist bisher noch unklar. Teilweise ist diese Form mit bestimmten Genen assoziiert, die nur in Zusammenwirkung mit verschiedenen Risikofaktoren (z. B. weibliches Geschlecht, kardiovaskuläre

Krankheiten, Diabetes, geringer Bildungsstand, möglicherweise auch Toxine) die Gefahr, an AD zu erkranken, erhöhen. Das APOE-Gen, welches auf Chromosom 19 lokalisiert ist und dessen Proteine physiologisch am Transport und Metabolismus von Lipiden beteiligt sind, ist ein solches Gen. Es sind drei verschiedene Allele dieses Gens bekannt: $\epsilon 2$, $\epsilon 3$ und $\epsilon 4$, wobei Träger des APOE-Allels $\epsilon 4$ als Risikogruppe für die Ausbildung von FAD gelten (ST GEORGE-HYSLOP 2000). Vermutlich spielen hier auch Umweltfaktoren eine Rolle, wie z. B. Kopfverletzungen (MAYEUX et al. 1995). Das Risiko, AD zu entwickeln, erhöht sich um das Dreifache bei heterozygoten Trägern des $\epsilon 4$ Allels, bei homozygoten Trägern jedoch um das Achtfache (CORDER et al. 1993).

PERICAK-VANCE et al. (1997) berichten über ein weiteres Gen, lokalisiert auf Chromosom 12, das das Risiko, an AD zu erkranken, erhöhen könnte. Es kodiert für α_2 -Makroglobulin, einen Proteaseinhibitor, der bei inflammatorischen Stimuli freigesetzt wird und durch Anlagerung an β -Amyloidpeptide eine fibrilläre Aggregation derselben verhindern kann (HUGHES et al. 1998), sowie Bestandteil von senilen Plaques ist. Außer den genannten werden eine Vielzahl anderer Prädispositionsfaktoren vermutet, die teilweise in Interaktion untereinander zur Erkrankung führen können. Es handelt sich hierbei z. B. um die Apolipoprotein E-Rezeptoren LRP und VLDL, das Angiotensin I Converting Enzyme, Cathepsin D, den Serotonintransporter und inflammatorische Proteine (RICHARD u. AMOUYEL 2001) oder auch das Insulin-degradierende Enzym (EDLAND et al. 2003). Es ist zu erwarten, dass noch verschiedene andere genetische Mutationen entdeckt bzw. schon entdeckte als Risikofaktoren für Morbus Alzheimer wieder verworfen werden.

2.2 Tiermodelle für die Alzheimersche Krankheit

Wie bereits mehrfach erwähnt, ist die Erkrankung des Morbus Alzheimer weder hinsichtlich ihrer Ätiologie, noch hinsichtlich der vorherrschenden Pathomechanismen, sowie in ihrer Diagnostik und Therapie zufriedenstellend aufgeklärt. Neben der Untersuchung von post mortem Hirngewebe, Laboruntersuchungen von Zerebrospinalflüssigkeit und Blut sowie der Anwendung bildgebender Verfahren bei Alzheimerpatienten werden seit langem auch Tiermodelle zum besseren Verständnis dieser Erkrankung genutzt. Im Folgenden soll kurz auf die verschiedenen existierenden Tiermodelle eingegangen werden, wobei der Schwerpunkt auf Mausmodelle gelegt worden ist.

2.2.1 Natürliche Tiermodelle

Alte Tiere, angefangen von den Nagern über Katzen, Hunde, Bären bis hin zu Affen wurden auf pathologische Merkmale und Verhaltensänderungen untersucht. Die Amyloidpathogenese, verbunden mit kognitiven Defiziten, wurde beispielsweise durch BONS und MESTRE (1993) bei einer Lemurenart, CUMMINGS et al. (1996) bei Hunden und die Taupathologie unter anderem durch HÄRTIG et al. (2000) bei verschiedenen Säugetierspezies beschrieben.

Nager entwickeln natürlicherweise keine AD-Pathologie (DUFF 2001); deswegen haben Mäuse als natürliche Tiermodelle keine Bedeutung.

2.2.2 Pharmakologische Modelle

DRACHMAN und LEAVITT (1974) beobachteten, dass durch Applikation von Scopolamin bei jungen gesunden Personen amnesieähnliche Symptome hervorgerufen wurden, wie sie auch bei Alzheimerpatienten bekannt waren. Daraufhin wurden bei verschiedenen Tierarten, und so auch bei Mäusen, die Scopolamin-induzierten Defizite untersucht und potenzielle Therapeutika getestet (NAKAHARA et al. 1988, VAMVAKIDES 2002). SEO et al. (2002) untersuchten die Wirkung von muskarinischen Rezeptoragonisten und -antagonisten auf die muskarinerg vermittelte APP-Prozessierung und NGF an Mäusen.

Jedoch spielen auch bei den pharmakologischen Modellen die Mäuse keine größere Rolle; hierfür werden wohl wegen des einfacheren Handlings vor allem Ratten genutzt.

2.2.3 Läsionsmodelle

Eine Möglichkeit, die cholinergen Defizite zu simulieren, besteht in der selektiven Läsion von cholinergen Neuronen des basalen Vorderhirns.

HOHMANN und COYLE (1988) untersuchten die akuten und chronischen Folgen einer elektrolytischen Läsion des basalen Vorderhirns bei Mäusen auf die kortikale synaptische Aktivität. Bei einem solchen Eingriff werden alle Nervenfasern und Zellen im Läsionsgebiet zerstört.

Eine selektive Zerstörung der Neuronen durch Übererregung, hervorgerufen durch die Applikation von Ibotensäure, Kainsäure oder NMDA, führte zu Läsionen, die bei den Labortieren (vor allem Ratten) starke Defizite bei kognitiven Tests hervorriefen, sich aber nicht als spezifisch und selektiv genug erwiesen (AULD et al. 2002). AMPA und Quisqualat wirken selektiver und AMPA-induzierte Läsionen bei Ratten sind durch Physostigmin bzw. Nikotin kompensierbar (MUIR et al. 1995).

Durch die Axotomie der Fimbria Fornix (LIU et al. 2002), einem Nervenfaserbündel, durch das 90% der cholinergen hippokampalen Axone, sowie auch serotoninerge und zu geringeren Anteilen noradrenerge und möglicherweise auch GABA-erge Fasern verlaufen (KRÜGEL et al. 2001), wurde eine dramatische antero- und retrograde Degeneration der septo-hippokampalen cholinergen Projektionen, verbunden mit einer Verringerung von ChAT und AChE, erreicht. Bei diesem Modell kann jedoch nicht zwischen cholinergen und nicht cholinergen Effekten unterschieden werden (SCHLIEBS u. BIGL. 1996).

Ein intrazerebroventrikulär zu applizierendes Immunotoxin zur selektiven Ausschaltung der cholinergen Neuronen im basalen Vorderhirn und ihrer Projektionen in Hippokampus und Kortex wurde von WILEY (1992) beschrieben. Hierbei handelt es sich um eine Kopplung des ribosomeninaktivierenden Proteins Saporin mit dem monoklonalen Antikörper 192IgG gegen den niedrig affinen p75 NGF-Rezeptor, der von cholinergen Neuronen exprimiert wird. Bei Mäusen wurde diese Methode von BERGER-SWEENEY et al. (2001) angewandt.

Nachdem bekannt wurde, dass Östrogentherapien das Risiko für AD verringern bzw. zu einer verzögerten Entwicklung der Symptome beitragen können (TANG et al. 1996; HENDERSON 2000), wurden Mäuse ovarioektomiert, um den Einfluss definierter Estradiolmengen auf die kompensatorische synaptische Sprossung nach mikrochirurgischer Läsion des entorhinalen Kortex zu klären (STONE et al. 1998). Schließlich wurde auch ein Tiermodell etabliert, bei dem durch Injektion von A β in

den frontalen Kortex die Zytotoxizität und der oxidative Stress, hervorgerufen durch das Amyloidpeptid, untersucht werden kann (KLEIN et al. 1999).

2.2.4 Transgene Tiere

Bei allen genannten Modellen spielen Mäuse keine oder lediglich eine geringe Rolle. Nach der Entdeckung der ersten APP-Mutation 1991 jedoch begann die Entwicklung von transgenen Mausmodellen mit Alzheimer-Pathologie (Übersicht s. DUFF 2001). Mäuse sind deshalb so interessant für diese Art von Modellen, da sich relativ schnell und leicht Inzuchtlinien schaffen lassen, die nach sieben bis zehn Bruder-Schwester-Verpaarungen genetisch weitgehend identisch sind, wodurch Neben-effekte durch heterozygote Erbmerkmale minimiert werden (SCHMIDT 2002). Zwar wird auch an und mit gentechnisch veränderten Ratten geforscht, doch ist die Genübertragung hier deutlich schwieriger und ineffektiver.

Inzwischen existieren zahlreiche verschiedene transgene Mauslinien; die meisten von ihnen überexprimieren humanes APP und/oder PS-1 bzw. PS-2 (AULD et al. 2002), deren Mutationen beim Menschen als ein Grund für die familiäre Form der AD identifiziert worden sind (CHARTIER-HARLIN et al. 1991, SHERRINGTON et al. 1995, LEVY-LAHAD et al. 1995). Diese Tiere zeigen typische Merkmale der Alzheimerschen Erkrankung, angefangen von β -Amyloidablagerungen (GAMES et al. 1995, HSIAO et al. 1996, HOLCOMB et al. 1999, DEWACHTER et al. 2000) über neuritische Dystrophie und reaktive Astrozytose und Mikrogliose (HSIAO et al. 1996, STURCHLER-PIERRAT 1997, APELT et al. 2001) bis hin zu Lerndefiziten bei räumlichen und nicht räumlichen Gedächtnistests (HSIAO et al. 1996, HOLCOMB et al. 1999). Auch aggressives Verhalten und Neophobie ist bei diesen Tieren beschrieben worden (MOECHERS et al. 1999, JANUS u. WESTAWAY 2001).

Andere transgene Mausmodelle, welche humane Taumutationen exprimieren, zeigen abnorme Tauhyperphosphorylierung mit Ausbildung neurofibrillärer Tangles (LEWIS et al. 2000, LIM et al. 2001), die jedoch bis auf eine bei LEWIS et al. (2001) beschriebene Ausnahme weder APP noch PS überexprimieren. LEWIS et al. (2001) erreichten durch Kreuzung einer APP-überexprimierenden Mauslinie mit einer Linie, die neurofibrilläre Tangles ausbildet (P301L), eine verstärkte Tangleformation im olfaktorischen Kortex sowie im limbischen System. GÖTZ et al. (2001) beschrieben, dass durch Injektion von synthetischen $A\beta_{42}$ in Hippokampus und Kortex bei

transgenen Mäusen mit Taupathologie die Ausbildung von neurofibrillären Tangles beschleunigt wird.

Ein weiterer genetischer Risikofaktor für AD-Entwicklung besteht im Vorhandensein von bestimmten Apolipoprotein E (APOE)-Allelen (HYMAN et al. 1996). BUTTINI et al. (1999) sowie WHITE et al. (2001) führten an transgenen Mäusen mit humanen APOE-Geninsertionen Experimente zur neuronalen Regeneration in Abhängigkeit vom exprimierten Protein durch. Sie stellten fest, dass Individuen, welche das ϵ 4-Allel tragen, nur verzögert kompensatorisch auf degenerative Prozesse reagieren. Das ist umso bedeutsamer, da die Neurodegeneration, die bei Alzheimerpatienten auftritt, von ϵ 4-Allelträgern schlechter kompensiert werden kann.

Auch der Nervenwachstumsfaktor (NGF) kann bei der Entstehung der AD unter Umständen eine Rolle spielen. Jedoch ist hier die Herstellung von transgenen Mäusen schwierig, da eine Ablation der NGF-Funktion zu einem letalen Phänotyp führt. Es wurde daraufhin eine transgene Maus entwickelt, die anti-NGF-Antikörper exprimiert (RUBERTI et al. 2000) und die eine neurodegenerative Pathologie aufwies, einschließlich Amyloidplaqueablagerung, hyperphosphoryliertem Tauprotein und Neuronenverlust sowie cholinergen Defiziten und Verhaltensanomalien (CAPSONI et al. 2000).

Um die molekularen Mechanismen, die mit den kognitiven Störungen bei der Alzheimer Krankheit assoziiert sind, besser verstehen zu können, wurden transgene Mäuse entwickelt, die das Enzym Azetylcholinesterase überexprimieren. Sie zeigten progressive Lern- und Gedächtnisstörungen durch den Verlust cholinерger Transmissionsmechanismen (BEERI et al. 1995).

2.2.5 Die transgene Maus Tg2576

Das transgene Mausmodell der familiären Form der Alzheimerschen Erkrankung Tg(HuAPP695.K670N-M671L)2576, im Weiteren als Tg2576 bezeichnet, (HSIAO et al. 1996), auf das sich diese Arbeit bezieht, exprimiert die humane APP695-Splicevariante mit der schwedischen Doppelmutation (K670N-M671L), kontrolliert durch einen Prion-Protein-Promotor aus dem Hamster. Die F1-Generation der C57B6/SJL-Mäuse wird rückgekreuzt mit C57B6-Tieren und es entstehen in der F2-Generation Individuen, bei denen das humane APP, verglichen mit endogenem Maus-APP, um das Fünffache überexprimiert ist (HSIAO et al. 1996). Das humane β -Amyloid ist bei diesen Tieren von Geburt an nachweisbar, zuerst in löslicher Form

und vom 8. bis 10. Lebensmonat an als Thioflavin S-positive β -Amyloidplaqueablagerungen, die ab ca. dem 15. Monat progressiv akkumulieren. Die β -Sekretase ist bei den Tg2576 vor allem in Neuronen nachgewiesen worden, aber auch Astrozyten in der Nähe von Amyloidplaques wiesen bei diesen Tieren β -Sekretase-Immunreaktivität auf (ROSSNER et al. 2001). Interessant ist, dass weibliche Tiere bis zu dreimal mehr Plaques ausbilden, als männliche (CALLAHAN et al. 2001). Unklarheit herrscht jedoch noch über die mögliche Vergleichbarkeit des exprimierten A β bei Mäusen und Menschen. Während strukturelle Unterschiede nicht ausgeschlossen werden können (KALBACK et al. 2002), konnte bereits mittels immunhistochemischer Methoden nachgewiesen werden, dass A β -Ablagerungen bei Tg2576-Mäusen bei sporadischen und familiären Alzheimerpatienten die gleichen Charakteristika hinsichtlich Anfärbbarkeit, Akkumulation und Zusammensetzung haben (TERAI et al. 2001). Diese Ablagerungen gehen einher mit Mikrogliaaktivierung (FRAUTSCHY et al. 1998; APELT u. SCHLIEBS 2001), wobei diese Zellen offensichtlich eher zur Vergrößerung der Plaques beitragen als zu ihrem Abbau (WEGIEL et al. 2001). Sowohl pro- als auch antiinflammatorische Zytokine werden hochreguliert (APELT u. SCHLIEBS 2001).

Hinsichtlich der Veränderung metabolischer Parameter liegen für die Tg2576 unterschiedliche Ergebnisse vor. Der Glukosestoffwechsel wies lediglich bei sehr alten Tieren mit sehr hoher Amyloidplaquebelastung Veränderungen auf (BIGL et al. 2003). Die Untersuchung des cholinergen Systems ergab keine einheitlichen Ergebnisse. Während GAU et al. (2002) keine signifikanten Veränderungen cholinergischer Kenngrößen (vesikulärer ACh-Transporter, hoch affine Cholinaufnahme, AChE, ChAT) finden konnten, berichten APELT et al. (2002) von einer regional erniedrigten Bindung an cholinerge Rezeptoren und hoch affine Cholintransporter. Möglicherweise sind diese Beobachtungen auf Degenerationen cholinergischer Strukturen in der Umgebung von Amyloidplaques zurückzuführen (LÜTH et al. 2003).

Neuronenverlust, ein zentrales Merkmal der Alzheimerschen Erkrankung, konnte bei diesen transgenen Tieren bisher nicht nachgewiesen werden (IRIZARRY et al. 1997; TOMIDOKORO et al. 2001). Letzterer Autor berichtet, dass die Neuronen vom β -Amyloid verdrängt werden. Bestätigt hingegen wurde das Amyloid-vermittelte Auftreten von neuritischer Dystrophie (HSIAO et al. 1996; IRIZARRY et al. 1997; QUINN et al. 2001; LÜTH et al. 2003) im Hirn dieser transgenen Mäuse, bei der die oxidative Schädigung eine wichtige Rolle spielt (SMITH et al. 1998). Sie manifestiert

sich im Hirn aufgrund des hohen Gehaltes an mehrfach ungesättigten Fettsäuren vor allem als Lipidperoxidation. Es wurde nachgewiesen, dass eine erhöhte Lipidperoxidation in den transgenen Tg2576-Mäusen der Amyloidplaquebildung vorausgeht (PRATICO et al. 2001). HARTLAGE-RÜBSAMEN et al. (2001) bestätigen auch das Vorkommen dystrophischer Neuronen in unmittelbarer, nicht aber in der weiteren Umgebung von β -Amyloidplaques bei diesen Mäusen.

Hinsichtlich der Lern- und Gedächtnisdefizite zeigten die Tiere, verglichen mit nicht transgenen Geschwistertieren, Defizite in zahlreichen Verhaltenstests, unter anderem bei Morris-Watermaze- und Y-Maze-Tests (HSIAO et al. 1996; 1997). Eine Beteiligung von A β an diesen kognitiven Verlusten wird vermutet. Die Berichte über den Beginn der Defizite, der mit drei (KING et al. 1999) bzw. neun bis elf Monaten (HSIAO et al. 1996) angegeben wird, führten zu der Debatte, ob das lösliche oder das unlösliche Amyloid für das abnorme Verhalten der Tiere verantwortlich sei. Alternativ könnte ein Zusammenwirken von löslichem und unlöslichem A β die unterschiedlichen Beobachtungen erklären (WESTERMAN et al. 2002).

3 Tiere, Material und Methoden

3.1 Tiere

Für die Studien wurden transgene Mäuse Tg2576 mit der schwedischen Doppelmutation des humanen Amyloidvorläuferproteins (APP695) in verschiedenen Altersstufen verwendet. Dabei wiesen die fünf Monate alten transgenen Mäuse noch keine β -Amyloidplaques auf, während die 17 Monate alten transgenen Tiere signifikante Plaqueablagerungen zeigten. Jeweils gleichaltrige Wurfgeschwister dienten als Kontrolle (Tab. 3.1).

Die Tiere wurden vom Medizinisch-Experimentellen Zentrum (MEZ) der Universität Leipzig zur Verfügung gestellt. (Tierversuchsvorhaben TVV 14/01, Regierungspräsidium Leipzig, den 29.11.2001).

	Alter (Monate)	Anzahl transgener Tiere (Tg 2576)	Anzahl nicht transgener Geschwister- tiere
biochemische/ radiochemische Analytik	5	5	5
	17	4	6
Immunhistochemie	21	2	2
ex vivo Markierung	14	-	3

Tab. 3.1: Anzahl und Alter der verwendeten Versuchstiere

3.2 Material

Alle Chemikalien wurden, wenn nicht anders erwähnt, bei den Firmen MERCK (Darmstadt), SIGMA (Deisenhofen) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe) erworben. Es wurde die höchstmögliche Reinheit und Qualität gewählt. Genauere Angaben zu den im Einzelnen verwendeten Chemikalien finden sich in Kap. 3.3.

3.3 Methoden

3.3.1 Rezeptorautoradiografie

3.3.1.1 Herstellung von Hirnschnitten für die Rezeptorautoradiografie

Die Tiere wurden mit CO₂ betäubt und getötet. Das Gehirn wurde entnommen und in Tissue-Tek® O.C.T™ Compound (SAKURA) eingebettet, bei -20°C tiefgefroren und mithilfe eines Mikrotom-Kryostats (Cryo-Star HM 560 M, MICROM) geschnitten. Die Dicke der koronalen Hirnschnitte betrug 12 µm. Diese wurden auf SuperFrost®Plus Objektträger (MENZEL-GLÄSER) aufgetaut und bei -20°C gelagert.

3.3.1.2 Durchführung der Rezeptorautoradiografie

Nach dem Auftauen und Trocknen der Hirnschnitte wurden diese in gepufferter Lösung vorinkubiert, um endogene Liganden auszuwaschen, danach getrocknet und im Reaktionspuffer, der den tritiummarkierten Liganden enthielt, in einer feuchten Kammer inkubiert.

Die unspezifische Bindung des Liganden wurde dadurch bestimmt, dass benachbarte Hirnschnitte mit einem Überschuss an nicht radioaktiv markiertem Liganden (oder adäquatem Blocker) inkubiert wurden. Dadurch wird der Radioligand aufgrund seiner niedrigeren Konzentration von den Rezeptorbindungsstellen verdrängt. Die im Anschluss noch detektierbare Menge des Radioliganden kann als unspezifische Bindung betrachtet werden. Bei der Bestimmung der Glukosetransporterichte mittels [³H]Cytochalsin-B wurde zusätzlich noch eine Blockung mit 0,5 M D-Glukose vorgenommen, da Cytochalsin-B auch unspezifisch am Hirnschnitt bindet. Diese unspezifische Bindung sollte durch die D-Glukose-Blockung ausgeschlossen werden. Die benutzten Radioliganden für den zu untersuchenden Rezeptor, die eingesetzten Konzentrationen sowie die verwendeten Puffer und Blockungsreagenzien zur Ermittlung der unspezifischen Bindung sind in der Tab. 3.2 aufgelistet.

Nach ausreichender Inkubationszeit in der feuchten Kammer erfolgte eine mehrfache Spülung der Objektträger, um ungebundene Liganden abzuwaschen, zunächst in eiskalter Pufferlösung, danach in bidestilliertem Wasser und die anschließende Trocknung im kalten Luftstrom.

Tab. 3.2: Übersicht über die verwendeten Radioliganden, Reaktionspuffer und Konzentrationen sowie Expositionszeiten

Rezeptor	Radioligand für Autoradiografie	Konzentration	Reaktionspuffer	Hersteller	Blocker und dessen Konzentration	Expositionszeit (Wochen)	Referenz
vesikulärer ACh-Transporter	[PiperidinyI-3,4- ³ H]L-AH5183 (Vesamicol; 34 Ci/mmol)	41,5 nM	50 mM Tris 120 mM NaCl 5 mM KCl 2 mM CaCl ₂ 1 mM MgCl ₂	NEN Life Science Products, Köln, Germany	Vesamicol (Tocris) 100 µM	4	ALTAR u. MARIEN (1988)
hoch affiner Cholintransporter	[Methyl- ³ H]Hemicholinium-3-Diazetat (HCh-3; 127,8 Ci/mmol)	2,8 nM	(120 mM NaCl 20,3 mM Na ₂ HPO ₄ 10m M D-Glukose 4,7 mM KCl 1,25 mM CaCl ₂ 1,2 mM MgSO ₄)	NEN Life Science Products, Köln, Germany	HCh-3 1 µM	5	SIHVER et al. (1997)
nikotinischer ACh-Transporter	[3,5- ³ H](N)-Cytisinhydrochlorid (38,2 Ci/mmol)	10 nM	50 mM Tris-HCl 120 mM NaCl 5 mM KCl 2,5 mM CaCl ₂ 1 mM MgSO ₄	NEN Life Science Products, Köln, Germany	Nikotin (Hydrogentartrat) 20 µM	6	SIHVER et al. (1997)

Rezeptor	Radioligand für Autoradiografie	Konzentration	Reaktionspuffer	Hersteller	Blocker und dessen Konzentration	Expositionszeit (Wochen)	Referenz
α_1 -Adrenozeptor	[7-Methoxy- ^3H]Prazosin (80,5 Ci/mmol)	1 nM	170 mM Tris-HCl; pH 7,4	PerkinElmer	Phentolamin 10 μM	4	HEIDER et al. (1997)
α_2 -Adrenozeptor	[Methyl- ^3H]Rauwolscin (77,5 Ci/mmol)	5 nM	50 mM Na/K-Phosphat-Puffer; pH 7,7	NEN Life Science Products, Köln, Germany	Phentolamin 100 μM	5	HEIDER et al. (1997)
β -Adrenozeptor	[Propyl- ^3H (N)]L-Dihydroalprenolol (DHA, 120 Ci/mmol)	1 nM	170 mM Tris-HCl + 10mM MgSO_4 ; pH 7,4	NEN Life Science Products, Köln, Germany	Isoproterenol 1 mM	7,5	HEIDER et al. (1997)
Glukosetransporter	[4- ^3H]Cytochalasin-B (15 Ci/mmol)	10 nM	50 mM Tris-HCl; pH 7,4	NEN Life Science Products, Köln, Germany	Cytochalasin 100 μM D-Glukose 500 mM	3	TUCKER u. CUNNINGHAM (1988)
Sulfonylharnstoffrezeptor	[Cyclohexyl-2,3- ^3H] (N)-Glibenclamid (52 Ci/mmol)	20 nM	2 mM HEPES; pH 7,4	NEN Life Science Products, Köln, Germany	Glibenclamid 10 u. 500 μM	4	LEVIN u. DUNN-MEYNELL (1997)

Tab. 3.2 (Fortsetzung): Übersicht über die verwendeten Radioliganden, Reaktionspuffer und Konzentrationen sowie Expositionszeiten

3.3.1.3 Auswertung der Rezeptorautoradiografie

Zur Auswertung wurden die Objektträger mit dem tritiummarkierten Gewebe auf Röntgenfilme (^3H -Hyperfilm, AMERSHAM) aufgebracht und in lichtdichten Röntgenkassetten bei 4°C gelagert. Nach unterschiedlichen Expositionszeiten in Abhängigkeit vom Liganden (s. Tab. 3.2) wurden die Filme entwickelt. Dazu wurden sie für fünf Minuten bei 20°C im Entwickler D19 (Kodak) belassen und anschließend 10 Minuten fixiert, gespült und getrocknet.

Die quantitative Analyse der Autoradiogramme wurde mithilfe des computer-gestützten Bildanalysesystems und unter Nutzung des Softwarepakets MCID 4.0 (Imaging Research Inc.) durchgeführt. Es wurden fünf Kortexregionen und der Hippokampus durch entsprechend große Boxen definiert, in denen die Rezeptorbindung vermessen wurde (Abb. 3.1, Tab. 3.3).

Die optische Dichte der Rezeptorbindungsstellen (in Form von Grauwerten auf den Filmen) wurde mittels Standards, die bei allen Expositionen mitgeführt wurden, ermittelt. Es handelte sich hierbei um Gewebeäquivalente mit jeweils definierter Tritiumkonzentration (nCi/mg Gewebeäquivalent); ^3H -Microscale Standards (AMERSHAM), wodurch eine Eichkurve erstellt werden konnte und es somit möglich war, die erhaltenen Grauwerte als fmol spezifisch gebundenen Radioliganden je mg Gewebe zu definieren. Für die Auswertung wurden Kortexareale und der Hippokampus mit definiertem Abstand vom Bregma (Schnittpunkt von Kranz- und Pfeilnaht des Schädels) (FRANKLIN et al. 1997) gewählt:

Ebene 12: Bregma: +1,2 mm bis +0,3 mm

Ebene 16: Bregma: +0,4 mm bis -1,0 mm

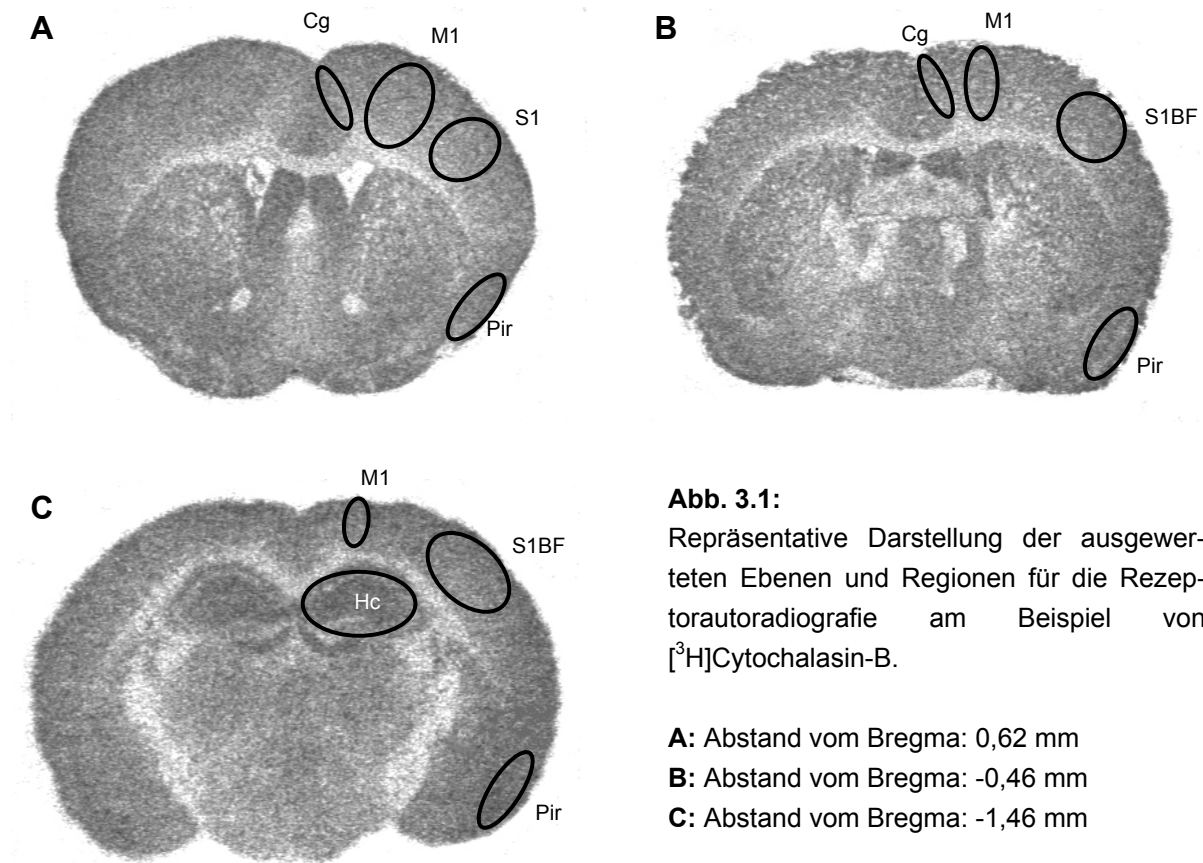
Ebene 21: Bregma: -1,1 mm bis -2,0 mm.

Tab. 3.3 enthält eine Übersicht über die ausgewählten Regionen.

Bezeichnung der Regionen	Abkürzung
zingulärer Kortex	Cg
primärer motorischer Kortex	M1
primärer somatosensorischer Kortex	S1
primärer somatosensorischer Kortex (barrel field)	S1BF
piriformer Kortex	Pir
Hippokampus	Hc

Tab. 3.3: Übersicht über die Bezeichnung der verschiedenen Hirnregionen und ihre Abkürzungen

Es wurden mindestens je zwei aufeinander folgende Schnitte vermessen. Die Schwärzung durch die unspezifische Bindung wurde jeweils vom Messwert abgezogen. Aus den Messwerten sowohl der transgenen als auch der Kontrolltiere wurde der Mittelwert gebildet.



3.3.2 Die ¹³¹I-Pentapeptid-Autoradiografie

Die Herstellung der Schnitte erfolgte wie in Kap. 3.3.1.1 beschrieben. Die Autoradiografie wurde nach einem modifizierten Protokoll von WU et al. (1997) durchgeführt. An die Trocknung der Schnitte schlossen sich eine 30-minütige Präinkubation in 0,05 M Tris-HCl, 0,1% Rindernormalserumalbumin (RSA) und 10 mM MnCl₂ und eine erneute Trocknung an. Anschließend erfolgte die Inkubation mit dem ¹³¹I-markierten Pentapeptid (bestehend aus den Aminosäuren Leu, Pro, Phe, Phe, Asp nach SOTO et al. (1998), freundlicherweise zur Verfügung gestellt durch Herrn Prof. B. Penke, Universität Szeged, Ungarn; die Iodmarkierung erfolgte durch Herrn Dr. J. Patt, Institut für interdisziplinäre Isotopenforschung, Leipzig) im o.g. Puffer für zwei Stunden bei Raumtemperatur mit einer Konzentration von 0,1

bzw. 0,5 $\mu\text{Ci/ml}$. Die Entfernung des nicht gebundenen Liganden wurde durch mehrere Waschschr tte erzielt:

viermal 2 Minuten im o.g. Puffer (4°C)

zweimal 5 Sekunden in bidestilliertem Wasser (4°C).

Getrocknet wurden die Schnitte im kalten Luftstrom und auf β -max-Filmen (AMERSHAM) bzw. im Micro-ImagerTM (BIOSPACE MESURES SA, Paris) exponiert. Die Auswertung der belichteten Filme erfolgte mithilfe des computergestützten Bildanalysesystems und unter Nutzung des Softwarepakets MCID 4.0 (Imaging Research Inc.). Die Auswahl und Größe der Kortex- bzw. Hippokampusregionen erfolgte wie in Kap. 3.3.1.3 beschrieben.

3.3.3 Immunhistochemische Methoden

3.3.3.1 Transkardiale Perfusion

Für die immunhistochemischen Untersuchungen an Hirnschnitten wurden die Tiere unter tiefer Narkose transkardial perfundiert. Dazu wurde die Kanäle in die linke Herzkammer eingeführt und mittels einer Perfusionspumpe (ISMATEC SA, Zürich) zuerst 50 ml 0.9%-ige NaCl-Lösung, um das Blut zu entfernen und danach 50 ml 4%-iges Paraformaldehyd (PFA) in 0,1 M Phosphatpuffer (PB), pH 7,4 eingeleitet, wodurch Proteine vernetzt und somit die Zellen stabilisiert wurden. Die Perfusionslösungen hatten eine Temperatur von 4°C. Die Nachfixierung der herauspräparierten Hirne erfolgte ebenfalls in 4%-igem PFA in 0,1 M PB, pH 7,4 über Nacht. Daran schloss sich eine  quibrierung in 30%-iger Saccharoselösung an. In dieser Lösung verblieb das Gewebe ca. einen Tag, danach konnten die Kryoschnitte angefertigt werden. Hierzu wurde das Hirn mittels Tissue Tek  auf dem Objekthalter des Gefrierschnitt-Mikrotoms (Leica) befestigt und bei -20 bis -25°C Koronalschnitte von 30 μm Dicke angefertigt. Die Schnitte wurden mit einem Pinsel vom Messer abgenommen und in 0,1 M Phosphatpuffer mit 0,05% Natriumazid überführt, worin sie bei 4°C gelagert wurden.

3.3.3.2 Immunhistochemische Markierung

Zur Darstellung verschiedener Zellbestandteile mittels Antigenmarkierung wurde nach folgendem Schema vorgegangen: Die frei flotierenden Schnitte wurden zuerst dreimal in 0,1 M Tris-gepufferter Kochsalzlösung (TBS), pH 7,4 gewaschen und 10

Minuten in 0,1%-igem Wasserstoffperoxid inkubiert, um die endogenen Peroxidasen zu deaktivieren. Es schloss sich wiederum ein dreimaliges fünfminütiges Waschen in 0,1 M TBS an. Die Maskierung von unspezifischen Epitopen erfolgte in 0,1 M TBS, 2% RSA und 0,3% Triton X100 (für Fluoreszenzmarkierungen 0,1% Triton X100) sowie 5% Ziegen- bzw. Eselnormalseum (Dianova, Hamburg)- abhängig von der Wirtsspezies des jeweiligen Sekundärantikörpers- eine Stunde bei Raumtemperatur. Danach wurde der erste Antikörper in der oben beschriebenen Blockierungslösung auf die Schnitte aufgebracht und über Nacht bei 4°C auf diesen belassen. Nach erneutem Waschen in 0,1 M TBS erfolgte eine einstündige Inkubation mit dem zweiten (biotinylierten) Antikörper in 0,1 M TBS und 2% RSA bei Raumtemperatur. Anschließend wurden nicht gebundene Antikörper abgespült und die Antikörperbindung durch eine Farbreaktion nachgewiesen. Dafür wurde 3'3-Diaminobenzidin (DAB) benutzt, in Verbindung mit der sogenannten Avidin-Biotin-Peroxidase-Technik: 12,5 µl Streptavidin (MoBiTec) (1 mg/ml) und 5 µl Biocapryl-Meerrettich-Peroxidase (0,5 mg/ml) in 0,1 M TBS und 2% RSA wurden zur Komplexbildung 30 Minuten gerührt und danach auf die Schnitte überführt. Nach einstündiger Inkubationszeit erfolgte eine erneute mehrfache Spülung der Schnitte in 0,1 M TBS mit anschließender Äquilibrierung in 0,05 M Trispuffer (TB). Es wurden 4 mg DAB in 0,05 M TB, pH 7,6 gelöst und 2 µl 30%-igem Wasserstoffperoxid dazu gegeben. In dieser Lösung wurden die Schnitte nach Sichtkontrolle ein bis 15 Minuten inkubiert; es bildete sich dabei ein braunes Präzipitat. Alternativ wurde auch mit einer Kombination aus DAB und Nickel gefärbt. Die Lösung besteht aus 40 mg Ammoniumnickelsulfat, 2 mg DAB und 2 µl 30%-igem Wasserstoffperoxid in 10 ml 0,05 M TB, pH 8,0. Das Präzipitat ist dunkelblau.

Nach der Anfärbung wurden die Schnitte nochmals in 0,1 M TBS gespült und danach auf gelatinierte bzw. mit Eiweißglyzerin beschichtete Objektträger aufgezogen, in Entellan eingedeckt und mithilfe des Zeiss Axioplan 2 Lichtmikroskops untersucht.

Für alle Färbungen wurde eine Negativkontrolle, die der Kontrolle und dem Ausschluss unspezifischer Bindungen des sekundären Antikörpers diente und nicht mit dem Primärantikörper inkubiert wurde, mitgeführt. Die verwendeten primären und sekundären Antikörper sind in Tab. 3.4 zusammengestellt.

Weiterhin wurde eine Färbung mit Fluoreszenzfarbstoffen durchgeführt. Es wurden Carbozyaninfarbstoffe (Cy), die an sekundäre Antikörper gekoppelt waren, (Esel- α -Ziege, Ziege- α -Kaninchen) verwendet. Die Cy-2-Kopplung erzeugte ein grünes

Fluoreszenzsignal, während die Cy-3-Kopplung ein rotes Signal unter Fluoreszenzlicht zeigte. Der simultane Nachweis zweier Antigene erfolgte über eine Doppelfluoreszenzmarkierung. Dabei wurde die Markierung mit Primär- und Sekundärantikörper so durchgeführt, wie oben beschrieben und anschließend nach erneuter Inkubation in der Blockungslösung und Spülung die Markierung mit Cy-3-gekoppeltem GFAP angeschlossen. Die fluoreszenzmarkierten Schnitte wurden mithilfe des Zeiss LSM 510 (konfokales Laser-Scanning-Mikroskop) untersucht. Tab. 3.5 zeigt die entsprechenden Parameter.

primärer Antikörper	Hersteller	Verdünnung	sekundärer Antikörper	Verdünnung
Ziege- α - α_4 nAChR (polyclonal)	Santa Cruz	1:200	Bio-Esel- α -Ziege	1:500
Kaninchen- α - α_7 nAChR (polyclonal)	Santa Cruz	1:50	Bio-Ziege- α -Kaninchen	1:500
Kaninchen- α -GLUT1 (polyclonal)	CHEMICON INTERNATIONAL	1:5000	Bio-Ziege- α -Kaninchen	1:500
AS 721	Ursula Mönning, Schering GmbH	1:500	Ziege- α -Kaninchen-POD	1:500
GFAP-Cy3 (monoclonal)	SIGMA	1:500	-	-

Tab. 3.4: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

	Anregung (nm)	Emission (nm)	Bandpassfilter (nm) (Laser-Scanning-Mikroskop)
Cy-2	488	510	505- 530
Cy-3	543	570	560- 610

Tab. 3.5: Anregungs- und Fluoreszenzwellenlängen

3.3.3.3 Plauefärbung mit Thioflavin S

Zur Darstellung der β -Amyloidplaques wurden zwei verschiedene Methoden verwendet. Einerseits mittels Antikörpern (Kap. 3.3.3.2), andererseits durch

Anfärbung mithilfe des Farbstoffes Thioflavin S. Dieser bindet spezifisch an die fibrillären Strukturen der β -Amyloidplaques (β A4), jedoch im Gegensatz zum Antikörper AS721 nicht an diffuse Plaques.

Die Schnitte wurden auf gelatinisierte Objektträger aufgezogen, getrocknet und gewässert. Anschließend wurden sie 20 Minuten mit 1% Thioflavin S in einer feuchten Kammer inkubiert, worauf eine 35-minütige Differenzierung in 80% Ethanol erfolgte. Nach erneuter Spülung und Trocknung wurden die Objektträger mit Entellan eingedeckt.

3.3.3.4 Azetylcholinesterasefärbung

Hierbei wurde nach dem Protokoll von ANDRÄ und LOJDA (1986) vorgegangen. Zunächst wurden die Schnitte luftgetrocknet, anschließend bei 37°C für 30 Minuten in 0,1 M Tris-Maleat Puffer, pH 5,0 präinkubiert und in die Reaktionslösung, bestehend aus:

112,5 ml 0,1 M Tris-Maleat Puffer, pH 5,0
15 ml 0,4 M Natriumzitat ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_7\text{O}_7$)
15 ml 0,12 M Kupfersulfat (CuSO_4)
7,5 ml 0,16 M Kaliumhexazyanoferat ($\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$)
75 mg Azetylcholiniodid (AChI), überführt.

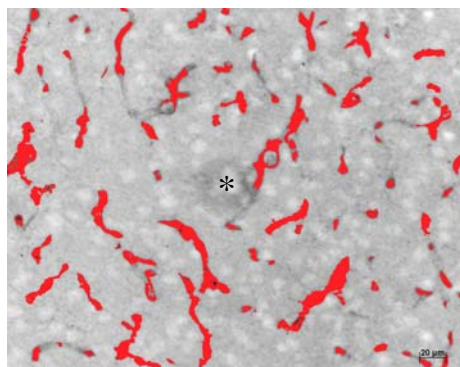
Die Zeitdauer, welche die Schnitte in der Reaktionslösung verweilen, wurde je nach der Intensität der Braunfärbung zwischen einer und drei Stunden variiert. Die Inkubationszeit wurde dabei so gewählt, dass die Intensität der Färbung bis zum Ende der Inkubation linear zunahm. Das Abbruch der Reaktion erfolgte durch kurzes Spülen in 0,1 M Tris-Maleat Puffer und anschließendes ebenfalls kurzes Tauchen in bidestilliertes Wasser. Die Dehydrierung in einer aufsteigenden Alkoholreihe (40, 70, 80, 96% Ethanol) schloss sich an.

Die Auswertung erfolgte mit Hilfe des computergestützten Bildanalysesystems und unter Nutzung des Softwarepakets MCID 4.0 (Imaging Research Inc.). Dabei wurde die Intensität der Färbung als relative optische Dichte ausgedrückt. Mindestens je zwei aufeinander folgende Schnitte der Ebenen 12 und 16 wurden vermessen. (Kap. 3.3.1.3). Es wurden fünf Kortexregionen durch entsprechend große Boxen definiert, in denen die optische Dichte ermittelt wurde (Abb. 1, Tab. 3). Aus den Messwerten sowohl der transgenen als auch der Kontrolltiere wurde der Mittelwert gebildet.

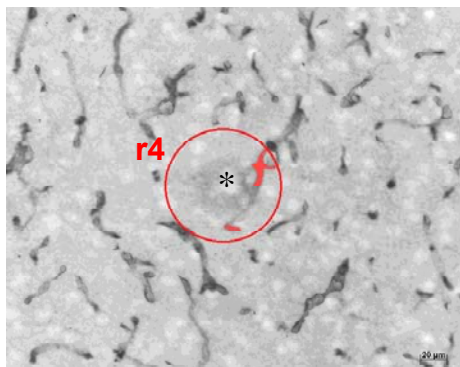
3.3.4 Auswertung der Kapillarmarkierung mittels GLUT1-Immunhistochemie

Die immunhistochemischen Färbungen (Kap. 3.3.3.2) wurden am Lichtmikroskop fotografisch dokumentiert. Es wurde darauf geachtet, dass nur vereinzelt liegende β -Amyloidplaques mit in die Auswertung einbezogen wurden, um Einflüsse von benachbarten Plaques ausschließen zu können. Die Messung erfolgte mittels des computergestützten Bildanalysesystems und unter Nutzung des Softwarepakets MCID 4.0 (Imaging Research Inc.).

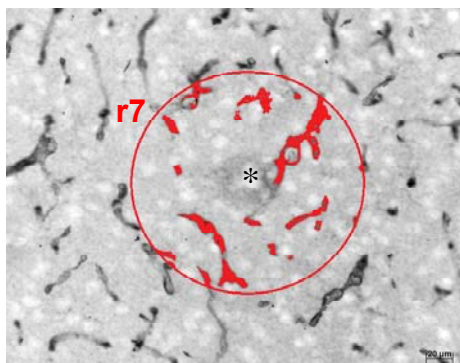
Die Auswertung wurde, wie in Abb. 3.2 veranschaulicht, durchgeführt



Es wurden zunächst die Kapillaren als bestimmte Grauwerte, die es zu messen galt, definiert und markiert. Anschließend erfolgte die Ermittlung des Radius des β -Amyloidplaques, der mittels Thioflavin S-Färbung dargestellt wurde (nicht gezeigt).



Um den Plaque wurde ein Kreis mit dem 4-fachen Radius des Plaques definiert. Durch Subtraktion der Plaquefläche vom Kreis $r4$ entsteht eine Ringfläche, die mit $R4$ bezeichnet wurde.



Anschließend wurde ein zweiter Kreis um den Plaque mit dem 7-fachen Radius des Plaques definiert. Wenn nun von dem äußeren Kreis $r7$ der innere Kreis $r4$ subtrahiert wird, entsteht ein Kreisring um den inneren Ring $R4$, dieser soll mit $R7$ bezeichnet werden.

Abb. 3.2: Darstellung der Ermittlung der Kapillarfläche in bestimmten Abständen vom β -Amyloidplaque (mit * gekennzeichnet).

Anschließend wurde die Anzahl und Größe der Kapillaren in den Flächen R4 und R7 bestimmt.

3.3.5 Die *in situ* Hybridisierung

Bei dieser Methode war ribonukleasefreies Arbeiten unerlässlich. Deshalb wurden alle Geräte vier Stunden bei 180°C hitzeinaktiviert. Zur Herstellung aller Lösungen wurde hitzeinaktiviertes und vorher mit 1% Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetztes Wasser genutzt, wodurch die RNAsen inaktiviert wurden.

3.3.5.1 Herstellung der Hirnschnitte

Die Tiere wurden dekapitiert, das Hirn zügig entnommen und bei -20°C tiefgefroren. Am Mikrotom-Kryostaten wurden 12 µm dünne Schnitte hergestellt, die auf zuvor mit 1% Poly-L-Lysin beschichtete Objektträger aufgetaut wurden. Diese Schnitte wurden bei -20°C gelagert.

3.3.5.2 Radioaktive Markierung der Oligonukleotide

Zur Detektion der mRNA (m₁ bis m₄) wurden radioaktiv markierte Oligonukleotide (5 ng/µl) aus der Ratte verwendet, die zuvor mithilfe des BLAST (National Center of Biotechnology Information) auf ihre Spezifität an der Maus getestet wurden (Tab. 3.6).

mRNA	Sequenz der Oligonukleotide	% Übereinstimmung mit Maussequenz
m ₁	5' TGG TGC CAA GAC AGT GAT GTT GGG ACT GAC AGC AGG GGG CAC TGA GGT	97%
m ₂	5' CTT GTA AGG ACT GGT AAT AGC CAA GCC ATT GTT CGA GGA GTT TGT TGA	95%
m ₃	5' GCT GAT GTT GGG AAA CAA AGG CGA GGT TGT ACT GTT ACT GTG CAA GGT	100%
m ₄	5' GCG CAC AGA CTG ATT GCC TGA GCT GCC ATT GAC AGG CGT GAA GTT	97%

Tab. 3.6: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotidsequenzen, Sequenzen nach BONNER et al. (1987)

Die radioaktive [^{35}S]-dATP-Markierung der Oligonukleotidsonden erfolgte unter Verwendung eines Terminalen Transferase-Kits (Terminal Transferase, Roche, Mannheim).

Reagenzien	Volumen
5x TdT Reaktionspuffer	10 μl
Oligonukleotid (m_1 - m_4) (0,36 pmol)	1 μl
CoCl_2 (25 mM)	5 μl
$[\alpha\text{-}^{35}\text{S}]\text{dATP}$ (1250 Ci/mmol), PerkinElmer Life Sciences	4 μl
DNA-deoxynucleotidylexotransferase, E.C. 2.7.7.31 (Terminale Transferase) (entspricht 440 U/ Reaktion)	1 μl
steriles Wasser	ad 50 μl

Die Reagenzien wurden kurz gemischt, anschließend für 60 Minuten bei 37°C inkubiert und auf Eis gestellt. Zur Abtrennung von nicht inkorporiertem ATP wurden die Proben über Bio-Spin 6-Chromatographiesäulen (Bio-Rad) zentrifugiert und das Eluat mit 2 μl DTT (1,4-Dithiothreitol) als Stabilisator versetzt.

3.3.5.3 Hybridisierung

Die Hybridisierung erfolgte nach einem Protokoll von BONDY et al. (1992). Die Schnitte wurden aufgetaut, getrocknet und in 4%-igem PFA fixiert. Für die Fixierung wurden folgende Inkubationslösungen und -zeiten benutzt:

Lösungen	Inkubationszeit
4% PFA in 1x PBS, pH 7,4	10 Minuten
dreimal 1x PBS, pH 7,4	je 5 Minuten
40% Ethanol	2 Minuten
70% Ethanol	2 Minuten
98% Ethanol	2 Minuten.

Pro Schnitt wurden 40 μl Hybridisierungspuffer aufgetragen, der sich aus folgenden Komponenten zusammensetzte:

Pufferkomponenten	Endkonzentration
100% Formamid	50%
25% Dextransulfat	5%
5 M NaCl	300 mM
1 M Tris-HCl	20 mM
0,5 M EDTA, pH 8,0	5 mM
0,5 M Natriumphosphatpuffer, pH 8,0	10 mM
50x Denhardt's Reagenz (50x entsprechen 1% Ficoll 400, 1% Polyvinylpyrrolidon, 1% RSA)	1x
transfer Ribonukleinsäure (t-RNA) aus Bäckerhefe	1 mg/ml
³⁵ S-Oligonukleotid	70 000 bis 100 000 cpm (counts per minute)
1 M DTT	10 mM.

Um eine gleichmäßige Verteilung der Hybridisierungslösung zu ermöglichen und das Eintrocknen auf den Schnitten zu verhindern, wurden diese mit einem Deckglas abgedeckt. Die Inkubation erfolgte in einer feuchten Kammer bei 42°C über Nacht.

Es schlossen sich folgende Waschgänge an:

Waschlösungen	Inkubationszeit	Temperatur
1x SSC*, pH 7,0, 1 ml 1 M DTT	30 Minuten	Raumtemperatur
1x SSC, pH 7,0, 1 ml 1 M DTT	30 Minuten	55°C
1x SSC, pH 7,0, 1 ml 1 M DTT	2 Minuten	Raumtemperatur
0,1x SSC, pH 7,0, 1 ml 1 M DTT	2 Minuten	Raumtemperatur
70% Ethanol	2 Minuten	Raumtemperatur
95% Ethanol	2 Minuten	Raumtemperatur

(*5x SSC entsprechen 150 mM NaCl, 15 mM Natriumzitat, pH 7,0)

Die Schnitte wurden luftgetrocknet und anschließend auf β-max-Filme aufgelegt. Die Expositionszeit betrug vier Monate bei 4°C. Die Entwicklung der Filme erfolgte im Entwickler D19 (Kodak) für fünf Minuten, danach wurden sie 10 Minuten fixiert, gespült und getrocknet.

Die quantitative Analyse der Autoradiogramme wurde mithilfe des computergetstützten Bildanalysesystems und unter Nutzung des Softwarepakets MCID 4.0 (Imaging Research Inc.) durchgeführt.

3.3.6 Ex-vivo Studien

3.3.6.1 Schwanzveneninjektion

Zur intravenösen Verabreichung von Substanzen wurde der Zugang via lateraler Schwanzvene gewählt. Die Schwänze der Mäuse wurden zunächst für einige Minuten in handwarmes Wasser getaucht, um eine Hyperämisierung zu erreichen. Die Fixierung erfolgte in einer Restraining Box (Charles River Laboratories), die Vene wurde angestaut und mittels einer zuvor mit Heparin-Natrium (Liquemin N 25000, Roche) gespülten Venenverweilkanüle, 0,6 x 19 mm (BD VasculonTM Plus), wurde die Substanz appliziert.

3.3.6.2 Darstellung der Azetylcholinesteraseaktivität im Mäusehirn

Zur Darstellung der Azetylcholinesteraseaktivität wurde nach einem modifizierten Protokoll von IRIE et al. (1994) vorgegangen. Das azetylcholinähnliche Substrat (L)-O-Acetyl-N-Methyl-3-Piperidinol [N-Methyl-¹⁴C] (20,2 mCi/mmol) wurde bei NEN Research Products DUPONT erworben. An die intravenöse Injektion von dieser Substanz (8,6 µCi in 100 µl steriler physiologischer Kochsalzlösung) schlossen sich fünf, 30 bzw. 180 Minuten Überlebenszeit an. Die Gewinnung und Aufarbeitung der Hirnschnitte erfolgte wie in Kap. 3.3.1 beschrieben.

3.4 Statistik

Zur Feststellung signifikanter Unterschiede zwischen den gemessenen Parametern in transgenen Tieren und nicht transgenen Wurfgeschwistern wurde zunächst der H-Test nach Kruskal-Wallace und anschließend der Mann-Whitney-Test (U-Test) ausgeführt. Die Berechnung erfolgte unter Zuhilfenahme des Softwarepakets SPSS. Ein signifikanter Unterschied wurde angenommen, wenn $p \leq 0,05$ ermittelt wurde. Es wurden nur dort statistische Berechnungen durchgeführt, wo n (Anzahl der untersuchten Tiere) größer bzw. gleich vier war.

4 Ergebnisse

Die Mauslinie Tg2576 gilt als ein Modell zur Simulation von pathologischen Veränderungen, welche im Gehirn von Alzheimerpatienten auftreten. In der vorliegenden Arbeit wurden Unterschiede zwischen der transgenen Mauslinie Tg2576 und nicht transgenen Wurfgeschwistern im adrenergen und cholinergen System sowie hinsichtlich des Glukosestoffwechsels und der Kapillardichte bei den transgenen Tieren in Abhängigkeit von der Entfernung zu den Plaques untersucht. Dafür wurden die biochemischen Methoden der Rezeptorautoradiografie, der *in situ* Hybridisierung sowie der Immunhistochemie angewendet. Weiterhin sollte mittels *ex vivo* Markierung die prinzipielle Möglichkeit einer Azetylcholinesterasemarkierung für die Anwendbarkeit als *in vivo* Marker zur frühzeitigen Darstellung morphologischer Veränderungen bei der Alzheimerschen Erkrankung sowie ein Pentapeptid als Marker für β -Amyloidplaques untersucht werden.

4.1 Die regionale Verteilung der β -Amyloidplaques im Hirn der transgenen Maus Tg2576

Die in dieser Arbeit untersuchten transgenen Mäuse Tg2576 exprimieren die schwedische Mutation des humanen Amyloidpräkursorproteins (APP695), was dazu führt, dass ca. ab dem zehnten Lebensmonat β -Amyloidplaques im zerebralen Kortex und Hippokampus abgelagert werden, die wahrscheinlich ursächlich für eine Reihe neuromorphologischer und neurochemischer Anomalien verantwortlich sind.

Die Auszählung der kortikalen und hippokampalen Plaquedichte (Kap. 3.3.1.3) bei den 17 Monate alten transgenen Tieren ergab, dass in den posterioren Hirnregionen die Dichte geringfügig höher ist als in den anterioren. Die geringste Plaquebeladung wurde insgesamt im primär somatosensorischen Kortex ermittelt und betrug 2,04% Plaquebeladung, gemessen als Fläche, die von den β -Amyloidplaques im Verhältnis zur Gesamtfläche der jeweiligen Hirnregion eingenommen wurde. Die höchste Plaquebeladung befand sich im posterioren Teil des primär motorischen Kortex. Sie betrug 17,7% im Verhältnis zur Gesamtfläche dieser Hirnregion (Abb. 4.1). Die Plaquebeladung schwankt relativ deutlich zwischen den einzelnen Individuen. Mäuse beider Geschlechter wurden zu gleichen Teilen in die Untersuchung mit einbezogen.

Ein weibliches Tier wies deutlich weniger Plaques im Kortex und Hippokampus auf als die beiden männlichen und die weitere weibliche Maus.

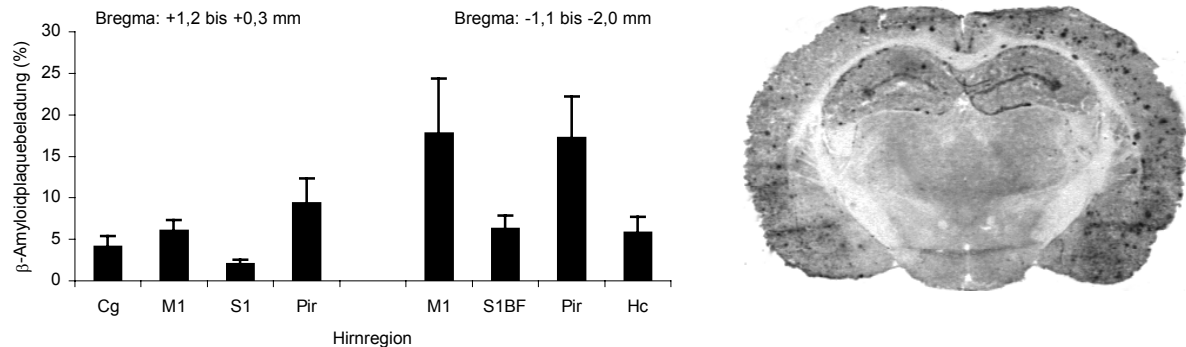


Abb. 4.1: Semiquantifizierung der β -Amyloidplaquebeladung nach immunhistochemischer Markierung mit dem Antikörper AS 721 mittels computergestütztem Bildanalysesystem und unter Nutzung des Softwarepakets MCID 4.0 (Imaging Research Inc.) in ausgewählten Hirnregionen; n=4 (links) und repräsentative Abbildung der Plaquetfärbung mit AS 721 und Diaminobenzidin-Nickel als Chromogen (Bregma: -2,0 mm) (rechts).

4.2 Das cholinerge System in Tg2576-Mäusen

Zur Erfassung der Unterschiede im cholinergen System von transgenen Mäusen (Tg2576) im Vergleich zu deren nicht transgenen Geschwistertieren wurden die Azetylcholinesteraseaktivität (Kap. 3.3.3.4) bestimmt und radioaktive Rezeptorautoradiografien (Kap. 3.3.1) für den vesikulären ACh-Transporter und den hoch affinen Cholintransporter sowie für die nikotinischen ACh-Rezeptoren durchgeführt. Mittels *in situ* Hybridisierung (Kap. 3.3.5) wurde das Verteilungsmuster der mRNA der muskarinischen Rezeptoren M_3 und M_4 untersucht. Die Analyse der Verteilung ausgewählter nikotinischer Rezeptoren erfolgte mittels Immunhistochemie.

4.2.1 Histochemische Darstellung der Azetylcholinesterase (AChE)

Die Azetylcholinesteraseaktivität wurde in verschiedenen zerebralen Ebenen und Hirnregionen bei fünf Monate alten (noch keine β -Amyloidplaques) und 17 Monate alten (signifikante Plaqueablagerungen) transgenen Mäusen (Tg2576) und nicht transgenen Geschwistertieren, die als Kontrolle dienten, gemessen. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Intensität der Markierung zwischen transgenen und Kontrolltieren bzw. zwischen den verschiedenen Altersstufen ermittelt werden (Abb. 4.2).

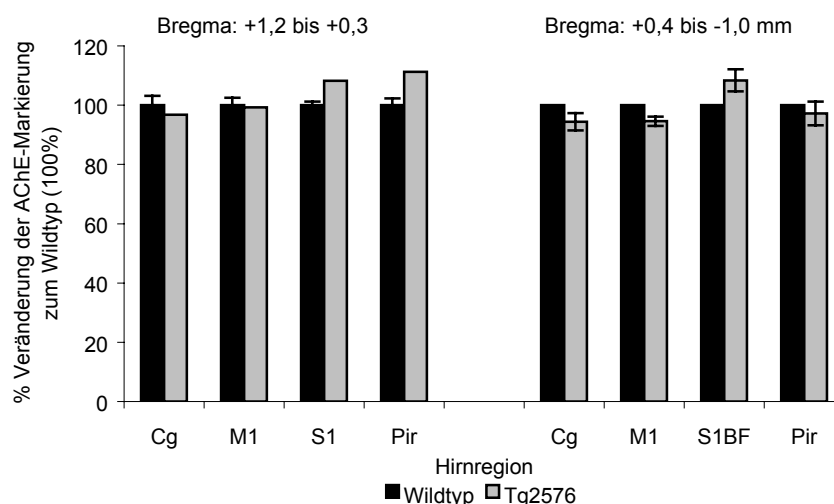


Abb. 4.2: Grafische Darstellung der AChE-Aktivität in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren zu nicht transgenen Geschwistertieren. Die AChE-Aktivität des Wildtyps wurde jeweils auf 100% skaliert, die AChE-Aktivität der transgenen Tiere wird als prozentuale Veränderung zu diesem Wert angegeben. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Aktivität.

Bregma: +1,2 bis +0,3 mm: Wildtyp n= 3; Tg2576 n=1

Bregma: +0,4 bis -1,0 mm: Wildtyp n= 2; Tg2576 n= 3.

4.2.2 Der vesikuläre Azetylcholintransporter (VACHT)

Nach der Synthese von Azetylcholin im Zytoplasma wird dieser Neurotransmitter in den synaptischen Vesikeln bis zur Freisetzung gespeichert. Der Transport in diese Vesikel wird durch einen VACHT-Transporter vermittelt, an den Vesamicol mit hoher Affinität bindet. Gemessen wurde mittels Rezeptorautoradiografie die [^3H]Vesamicol-Bindung (Kap. 3.3.1) an den vesikulären Azetylcholinrezeptor (Abb. 4.9) in drei zerebralen Schnittebenen und verschiedenen Kortexarealen sowie im Hippokampus (Kap. 3.3.1.3). Es konnte eine relativ gleichmäßige Verteilung der Rezeptoren in Hippokampus und Kortex festgestellt werden. Untersucht wurden zwei Altersstufen. Bei den fünf Monate alten Tieren konnten keine signifikanten Veränderungen der [^3H]Vesamicol-Bindung zwischen transgenen und nicht transgenen Tieren festgestellt werden.

Die Autoradiografie der 17 Monate alten Tiere ergab eine signifikante Erhöhung ($p \leq 0,05$) bei den transgenen Tieren im zingulären Kortex (Cg) mit 31,5%, im primären motorischen Kortex (M1) mit 37,9%, im piriformen Kortex (Pir) mit 27,4% sowie im primären somatosensorischen Kortex (barrel field) (S1BF) mit 40% (Abb. 4.3).

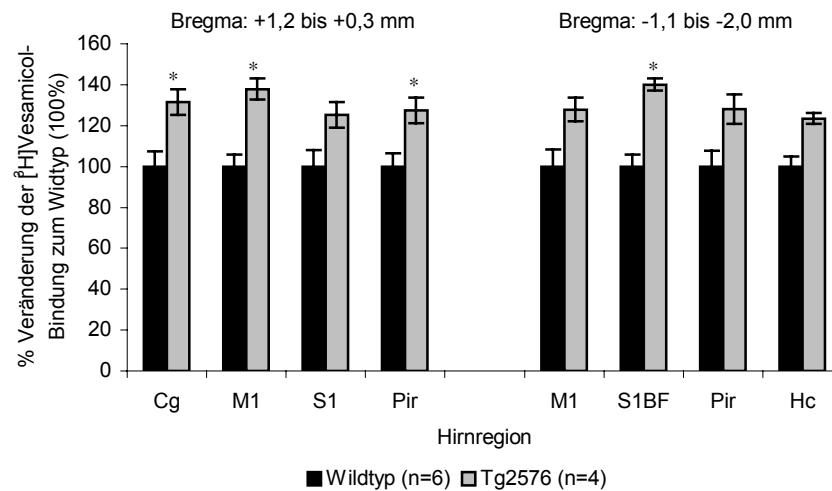
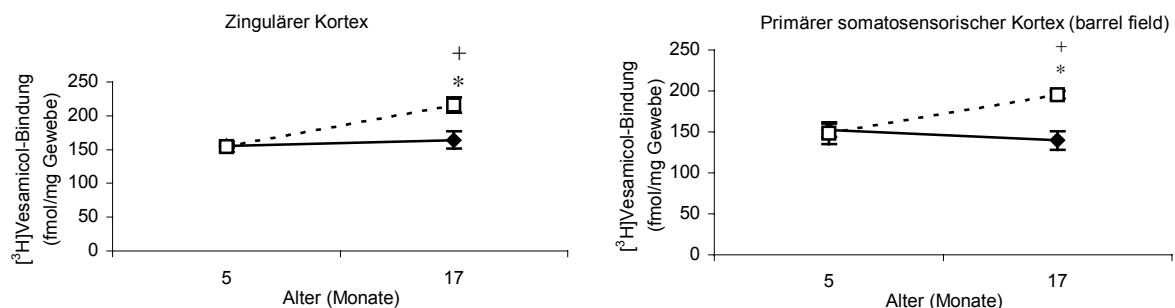


Abb. 4.3: Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Vesamicol-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren, in Prozent Veränderung im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Rezeptorbindung. (* $p \leq 0,05$).

Altersabhängig nehmen die vesikulären ACh-Transporter-Bindungsstellen bei den transgenen Tieren zu. Signifikante Anstiege im Vergleich zu den nicht transgenen Wurfgeschwistern ($p \leq 0,05$) wurden im zingulären (28%), primären motorischen (36%) und somatosensorischen Kortex (S1) (24%), im anterioren piriformen Kortex (30%) sowie im primären somatosensorischen Kortex (barrel field) (24%) ermittelt. Im Vergleich der Altersstufen der transgenen Tiere untereinander konnte ein signifikanter Anstieg der [^3H]Vesamicol-Bindungsstellen in allen untersuchten anterioren Hirnregionen (32% im zingulären Kortex, 36% im primären motorischen Kortex, 29% im somatosensorischen Kortex und 27% im anterioren piriformen Kortex) sowie im primären somatosensorischen Kortex (barrel field) (42%) und im posterioren piriformen Kortex (33%) ermittelt werden. (Abb. 4.4).



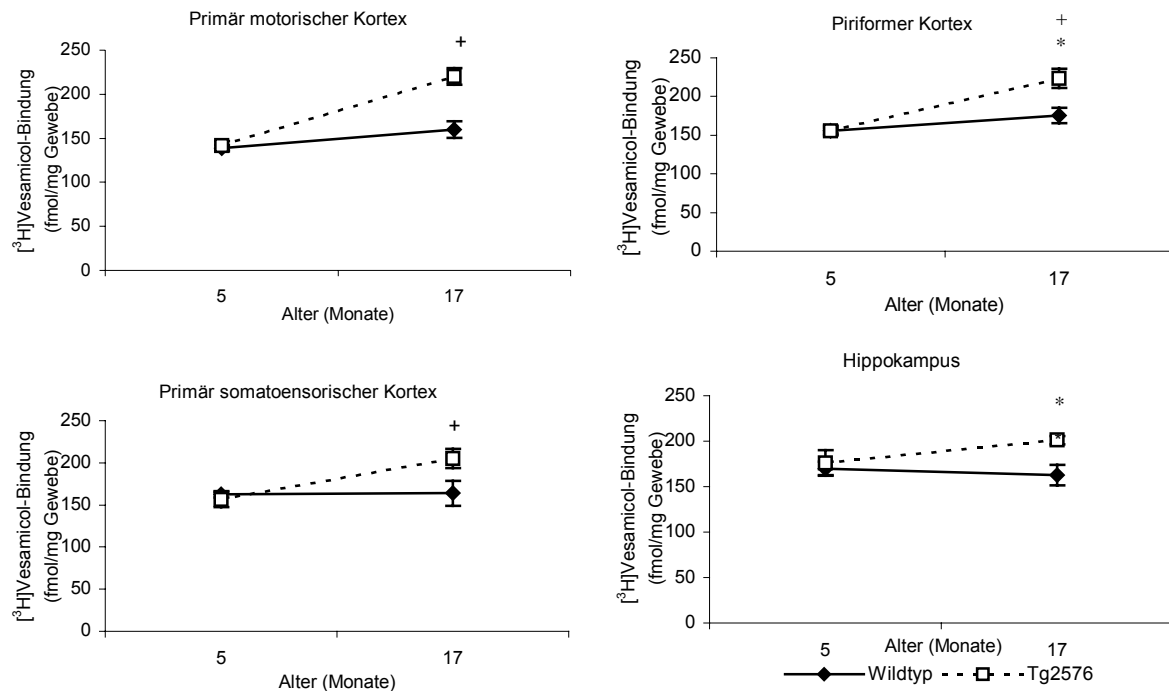


Abb. 4.4: Grafische Darstellung der altersabhängigen Entwicklung der $[^3\text{H}]$ Vesamicol-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von Tg2576- und Kontrollmäusen in fmol pro mg Gewebe. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Rezeptorbindung.

Rechts: Bregma: +1,2 bis +0,3 mm, links: Bregma: -1,1 bis -2,0 mm.

* $p \leq 0,05$: verglichen mit nicht transgenen Geschwistertieren

+ $p \leq 0,05$: verglichen mit 5 Monate alten transgenen Tieren

4.2.3 Der hoch affine Cholintransporter (HACU)

Das hoch affine Cholintransportsystem ist an präsynaptischen cholinergen Terminalen lokalisiert. Bei der quantitativen Erfassung des Cholintransports wird die Eigenschaft von $[^3\text{H}]$ Hemicholinium-3 ausgenutzt, mit hoher Affinität und Spezifität an Cholintransporter zu binden (Abb. 4.9). Untersucht wurde auch hier die Bindung des Liganden in verschiedenen Kortexarealen und im Hippokampus (Kap. 3.3.1.3). Die regionale Verteilung der Rezeptoren in den einzelnen Hirnregionen war relativ gleichmäßig. Bei den jüngeren Tieren (fünf Monate alt) wurde anterior eine signifikante Verringerung der $[^3\text{H}]$ Hemicholinium-3-Bindung beobachtet, die im Vergleich zu den nicht transgenen Kontrollen im zingulären Kortex bei 32%, im primären motorischen Kortex bei 40% und im somatosensorischen Kortex bei 35% lag ($p \leq 0,05$). Im piriformen Kortex (26%) und in den hinteren Hirnregionen waren diese Veränderungen mit 7% (primär motorischer Kortex) bzw. 34% (piriformer Kortex) Verringerung der Bindung, sowie mit 12% (primär somatosensorischer

Kortex, barrel field) und 60% (Hippokampus) Erhöhung der Bindungsspiegel im Vergleich zu den nicht transgenen Kontrollen nicht mehr signifikant (Abb. 4.5).

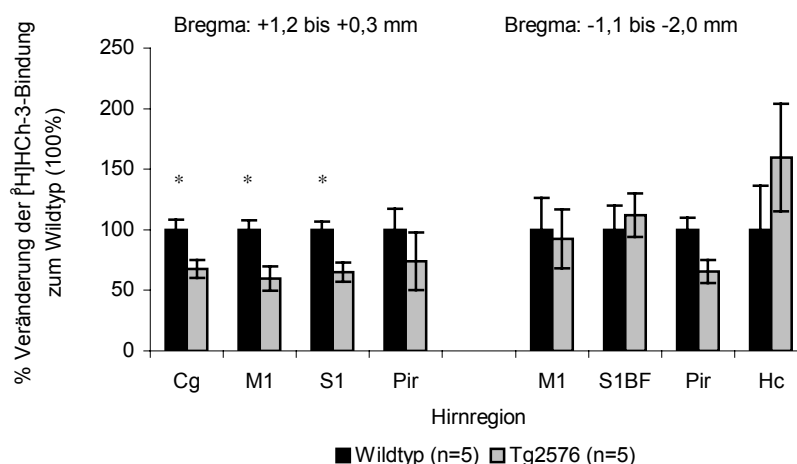


Abb. 4.5: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Hemicholinium-3-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 5 Monate alten, transgenen Tieren, in Prozent Veränderung im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Rezeptorbindung. (* $p \leq 0,05$).

Bei den 17 Monate alten Tieren (Abb. 4.6) konnten bei den transgenen Tieren im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen ebenso geringere [^3H]HCh-3-Bindungsspiegel in der posterioren Hirnregion festgestellt werden; sie waren allerdings weniger prominent und nicht signifikant. Die Verringerung der [^3H]HCh-3-Bindungsspiegel bei Tg2576-Mäusen, verglichen mit den nicht transgenen Geschwistertieren betrug im primär motorischen Kortex 31%, im primär somatosensorischen Kortex (barrel field) 28%, im piriformen Kortex 27% und im Hippokampus 25%. In den anterioren Hirnregionen wurde eher eine Erhöhung der Bindungsspiegel bei den transgenen Tieren im Vergleich zum Wildtyp gefunden.

Um zu erfassen, ob die regionale Plaquedichte mit der Abnahme der cholinergen Terminalen korreliert, wurde die prozentuale Veränderung der [^3H]Hemicholinium-3-Bindung in den untersuchten kortikalen Regionen von Tg2576-Tieren im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen gegen die entsprechende regionale β -Amyloidplaquebelastung aufgetragen. Weder anterior noch posterior ergab sich eine signifikante Korrelation (Abb. 4.7).

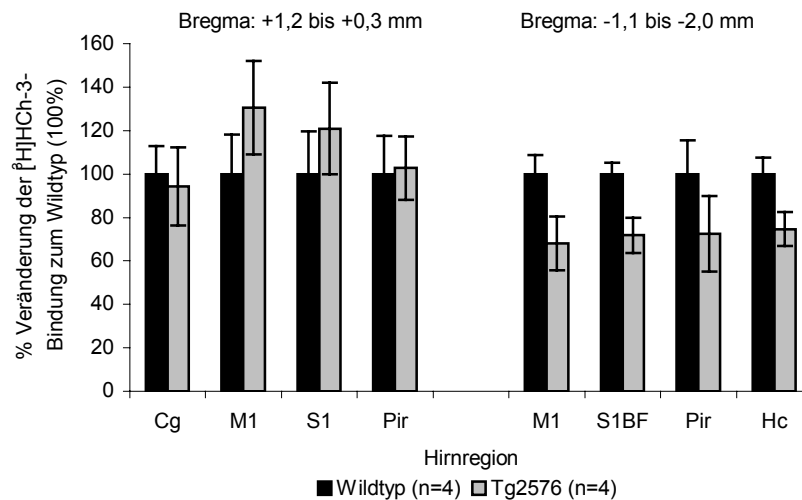


Abb. 4.6: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Hemicholinium-3-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren, in Prozent Veränderung im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Rezeptorbindung.

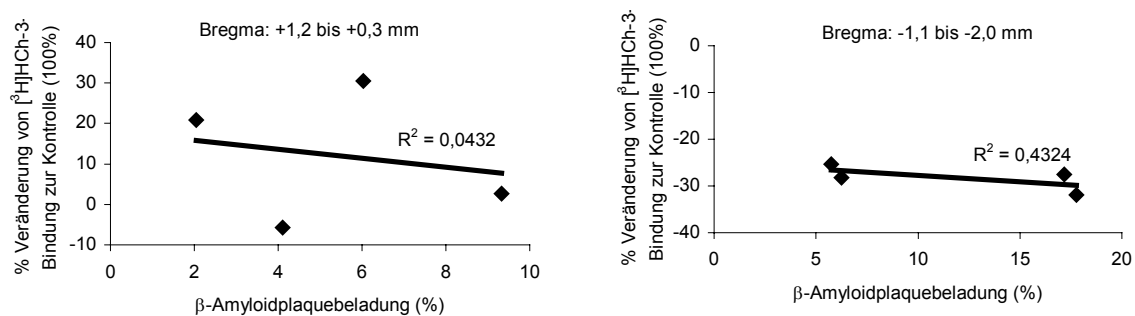
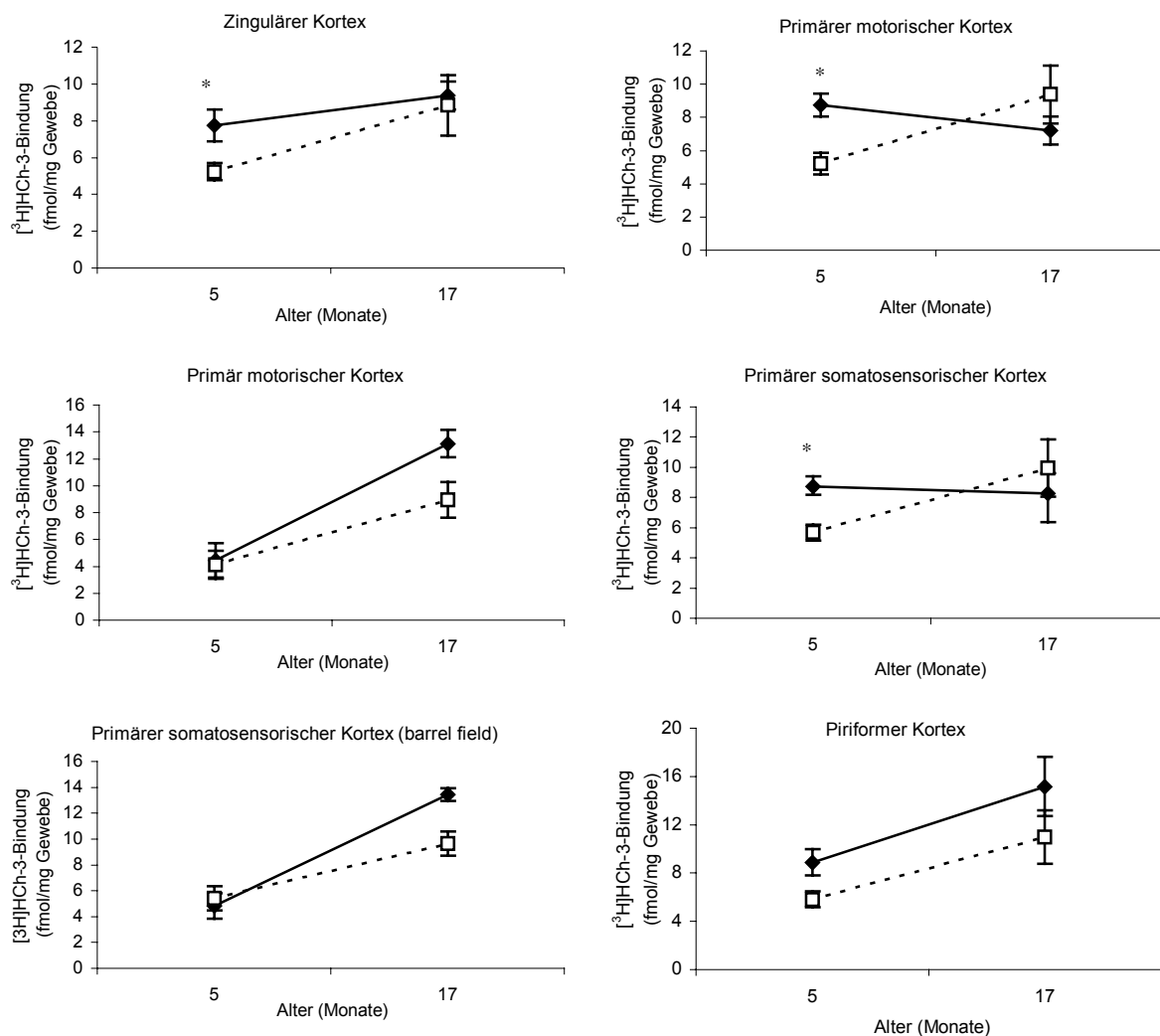


Abb. 4.7: Grafische Darstellung der Korrelation zwischen der regionalen β -Amyloidplaquebelastung und der prozentualen Veränderung der [^3H]Hemicholinium-3-Bindung an den hoch affinen Cholintransporter in den entsprechenden Hirnregionen (Cg, M1, S1, Pir, S1BF).

Altersabhängig gestaltet sich die Verteilung der Radioligandbindung an den hoch affinen Cholintransporter nicht einheitlich. Generell steigen die Bindungsspiegel in den ausgewerteten Hirnregionen sowohl bei den transgenen Tieren als auch beim Wildtyp mit zunehmendem Alter der Mäuse an. Eine Ausnahme stellen hier lediglich anterior der primär motorische sowie der primär somatosensorische Kortex dar, in dem beim Wildtyp eine Abnahme der [^3H]Hemicholinium-3-Bindung um 17% bzw. 5% zu verzeichnen war, sowie der piriforme Kortex anterior, wo der Bindungsspiegel der 17 Monate alten Tiere im Wildtyp 34% unter dem der fünf Monate alten nicht transgenen Tiere lag, während die Ligandbindung für die transgenen Tiere in dieser Region lediglich um 8% zurückging. Die altersabhängigen Zunahmen der

Bindungsspiegel bei den 17 Monate alten im Vergleich zu den fünf Monate alten transgenen Mäusen liegen zwischen 39% im Hippokampus und 80% im anterioren primär motorischen Kortex, bei den nicht transgenen Wurfgeschwistern zwischen 21% im zingulären Kortex und 195% im primär motorischen Kortex posterior. Im zingulären, primären motorischen und somatosensorischen Kortex fällt außerdem auf, dass die Anzahl der Bindungsstellen bei den transgenen Tieren zunächst deutlich geringer ist als bei den Kontrolltieren. Im Verlauf der Entwicklung nehmen die Bindungsstellen bei den transgenen Tieren schneller zu als bei den Kontrollen, um im Alter von 17 Monaten das Defizit ausgeglichen bzw. sogar leicht erhöhte Werte zeigen (Abb. 4.8).



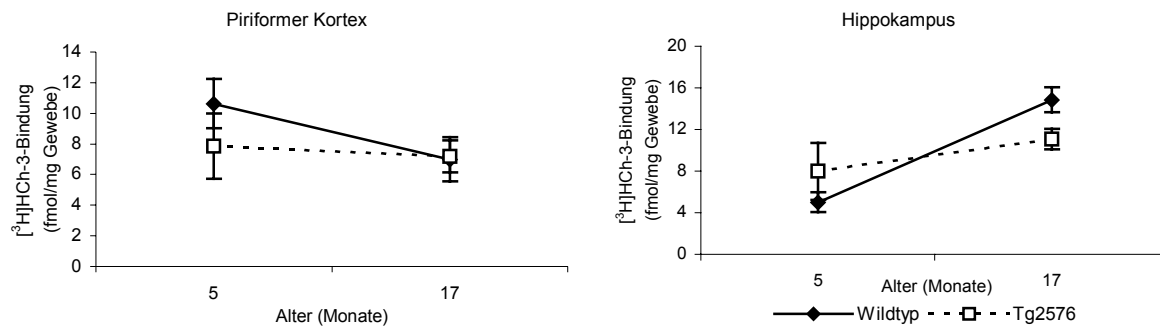


Abb. 4.8: Grafische Darstellung der altersabhängigen Entwicklung in der [^3H]Hemicholinium-3-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von Tg2576- und Kontrollmäusen in fmol pro mg Gewebe. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Rezeptorbindung.

Rechts: Bregma: +1,2 bis +0,3 mm, links: Bregma: -1,1 bis -2,0 mm.

* $p \leq 0,05$: verglichen mit nicht transgenen Geschwistertieren

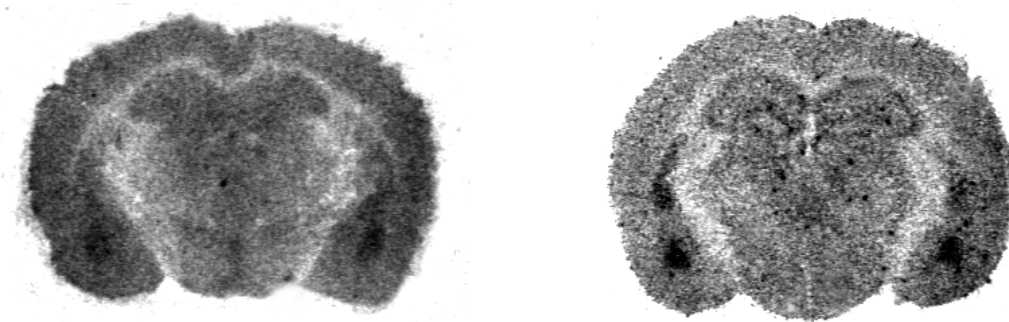


Abb. 4.9: Repräsentative Darstellung der autoradiografisch ermittelten vesikulären Azetylcholintransporter-Bindungsstellen (links) bzw. der hoch affinen Cholinaufnahme-Bindungsstellen (rechts)

4.2.4 Die *in situ* Hybridisierung der mRNA für muskarinische Rezeptoren

Um die Veränderungen im Genexpressionsmuster der muskarinischen Azetylcholinrezeptorsubtypen M_3 und M_4 zwischen transgenen und nicht transgenen Tieren zu bestimmen, wurden radioaktive *in situ* Hybridisierungen an Hirnschnitten fünf und 17 Monate alter Tiere (Abb. 4.13) in verschiedenen zerebralen Kortextarealen und im Hippokampus durchgeführt (Kap. 3.3.5 und 3.3.1.3).

Für die m_3 muskarinische Azetylcholinrezeptor mRNA wurde bei den jüngeren Tieren (fünf Monate alt) eine geringfügig erhöhte Genexpression der transgenen Tiere im zingulären (19%) und anterioren primären motorischen Kortex (13%), sowie im primär somatosensorischen Kortex (25%) gefunden, wobei diese Erhöhung nicht signifikant war (Abb. 4.10).

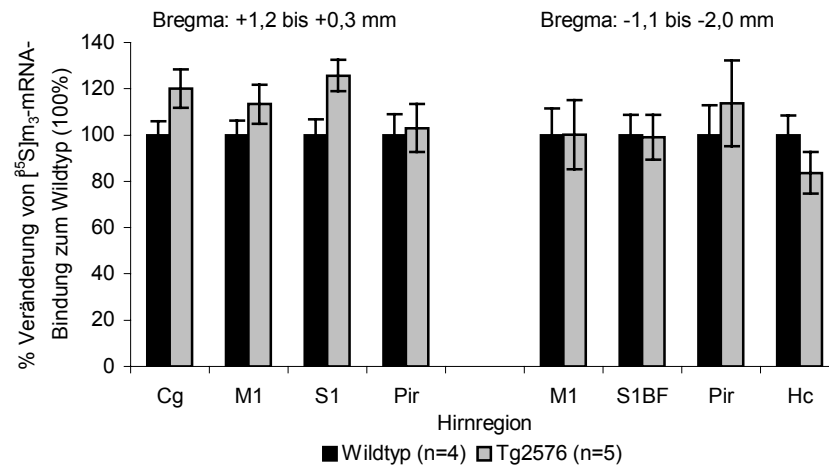


Abb. 4.10: Grafische Darstellung der Quantifizierung der radioaktiven *in situ* Hybridisierung zur Detektion der m_3 muskarinischen Azetylcholinrezeptor mRNA in ausgewählten Hirnregionen von 5 Monate alten transgenen Tieren, im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren, dargestellt als prozentuale Änderung relativ zur Kontrollgruppe. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Genexpression.

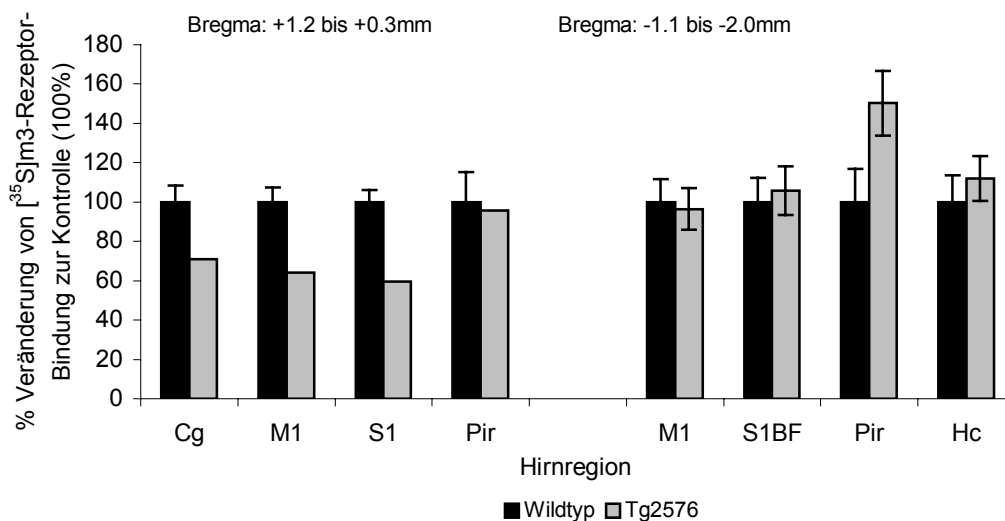


Abb. 4.11: Grafische Darstellung der Quantifizierung der radioaktiven *in situ* Hybridisierung zur Detektion der m_3 muskarinischen Azetylcholinrezeptor mRNA in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren, im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren, dargestellt als prozentuale Änderung relativ zur Kontrollgruppe. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Genexpression.

Bregma: +1,2 bis +0,3 mm: n=5 (Wildtyp); n=2 (Tg2576)

Bregma: -1,1 bis -2,0 mm: n=6 (Wildtyp); n=4 (Tg2576).

Bei den älteren Tieren (17 Monate) hingegen ist die Genexpression bei den transgenen Tieren im motorischen (35%) und primär somatosensorischen Kortex

(40%) in den anterioren Hirnebenen deutlich verringert, während in den posterioren Hirngebieten, außer im piriformen Kortex, wo die Dichte der mRNA um 50% zunahm, keine Veränderungen im Vergleich zu den nicht transgenen Wurfgeschwistern gemessen wurden (Abb. 4.11).

Für die mRNA des M_4 -Azetylcholinrezeptorsubtyps (Abb. 4.13) wurden bei den fünf Monate alten Tieren keine signifikanten Unterschiede in der Genexpression in den untersuchten Hirnregionen zwischen transgenen Tieren und dem gleichaltrigen Wildtyp gefunden. Bei den 17 Monate alten Tieren konnten im anterioren Hirnbereich tendenziell höhere Genexpressionen der transgenen Mäuse ermittelt werden. Sie betrugen im zingulären Kortex 24%, im primär motorischen Kortex 34%, im primär somatosensorischen Kortex 16% und im piriformen Kortex 35%. Diese Unterschiede sind allerdings im Rahmen der Standardabweichungen nicht signifikant. In den posterior gelegenen Hirnarealen ergab sich hingegen eine Verringerung der Genexpression im primär motorischen Kortex (27%) und im Hippokampus (46%), wobei hier auch keine Signifikanz vorlag (Abb. 4.12).

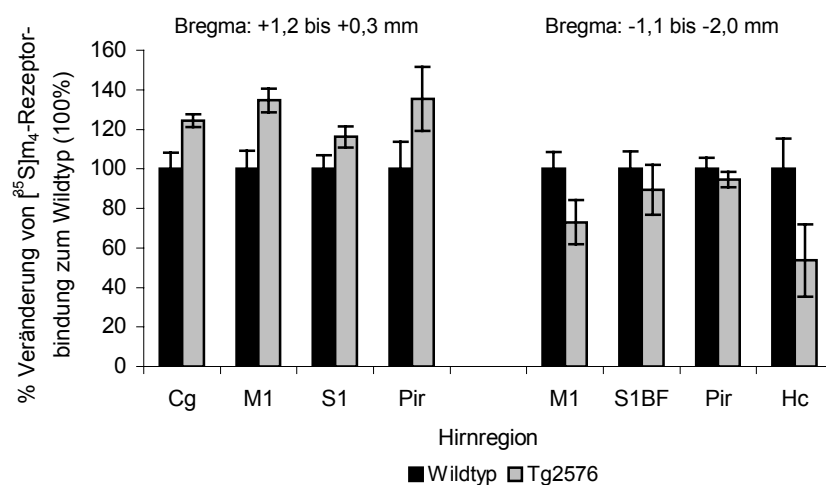


Abb. 4.12: Grafische Darstellung der Quantifizierung der radioaktiven *in situ* Hybridisierung zur Detektion der m_4 muskarinischen Azetylcholinrezeptor mRNA in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren, im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren, dargestellt in Prozent. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Rezeptorbindung.

Bregma: +1,2 bis +0,3 mm: n=6 (Wildtyp); n=4 (Tg2576)

Bregma: -1,1 bis -2,0 mm: n=5 (Wildtyp); n=3 (Tg2576).

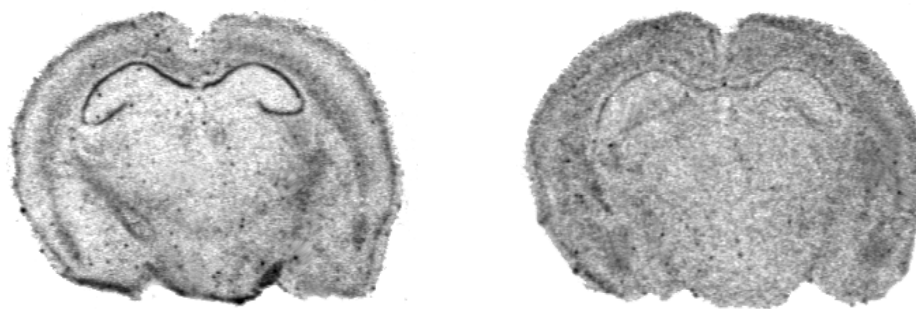


Abb. 4.13: Repräsentative Darstellung der mittels ^{35}S *in situ* Hybridisierung erhaltenen muskarinischen Azetylcholinrezeptor mRNA-Verteilung in Hirn der Maus. Links: m_3 -Rezeptor mRNA, rechts: m_4 -Rezeptor mRNA.

4.2.5 Die nikotinischen Azetylcholinrezeptoren (nAChR)

Bei den neuronalen nikotinischen Azetylcholinrezeptoren treten im Hirn besonders häufig die α_7 -, sowie die α_4 -Rezeptoruntereinheiten auf. Zur Untersuchung der durch die Insertion der humanen APP695-Isoform mit schwedischer Mutation in das Mausgenom hervorgerufenen Veränderungen auf die nikotinischen ACh-Rezeptoren wurde deshalb die Autoradiografie mit [^3H]Cytisin (Kap. 3.3.1), einem selektiven Liganden für die α_4 -Untereinheit in nikotinischen Rezeptoren (FLORES et al. 1992), durchgeführt. Außerdem sollten mithilfe der immunhistochemischen Markierung mögliche Veränderungen in Anzahl und Expressionsgrad der α_7 - und α_4 -Rezeptor-exprimierenden Zellen in unmittelbarer Umgebung der Plaques festgestellt werden.

4.2.5.1 Quantifizierung der Radioligandbindung von [^3H]Cytisin

Die Bindungsspiegel der [^3H]Cytisin-Bindung wiesen in der Hirnrinde eine relativ gleichmäßige Verteilung auf; lediglich im piriformen Kortex und im Hippokampus wurden geringfügig niedrigere Werte ermittelt. Weder bei den jüngeren (fünf Monate), noch bei den älteren (17 Monate) Tieren konnten Unterschiede zwischen den transgenen Mäusen und den nicht transgenen Geschwistertieren hinsichtlich der Rezeptorbindung ermittelt werden.

Die altersabhängige Verteilung der [^3H]Cytisin-Bindung an den nikotinischen Azetylcholinrezeptor wies eine starke Erhöhung der Bindungsspiegel bei den 17 Monate alten Tieren sowohl bei den Tg2576-Mäusen als auch beim Wildtyp im Vergleich zu den fünf Monate alten transgenen und nicht transgenen Tieren auf (Abb. 4.14).

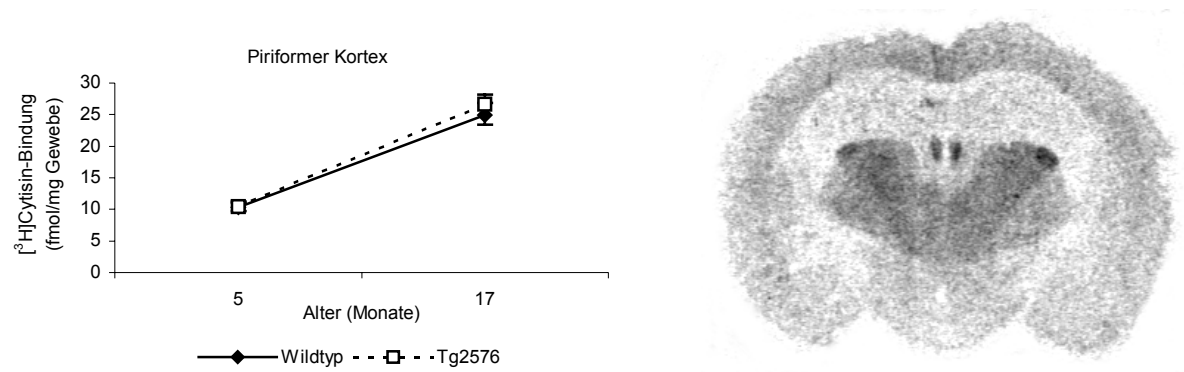


Abb. 4.14: Grafische Darstellung der altersabhängigen Entwicklung der [³H]Cytisin-Bindung im piriformen Kortex von Tg2576- und Kontrollmäusen in fmol pro mg Gewebe. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Rezeptorbindung (links).

Rechts: Repräsentative Darstellung der autoradiografisch ermittelten [³H]Cytisin-Bindungsstellen im Hirn der Maus.

4.2.5.2 Immunhistochemischer Nachweis der α_4 -und α_7 -Untereinheit der nikotinischen Azetylcholinrezeptoren in Tg2576-Mäusen

Um die Unterschiede zwischen den transgenen Tieren und den nicht transgenen Wurfgeschwistern auf die zelluläre Expression der nikotinischen Rezeptoren im Mäusehirn zu charakterisieren, wurden immunhistochemische Analysen zum Nachweis der Lokalisation der nikotinischen Subtypen α_4 und α_7 durchgeführt. Die α_4 nAChR-tragenden Neurone konnten mittels Antikörpermarkierung (Kap. 3.3.3.2) in allen kortikalen Arealen nachgewiesen werden (zingulärer, primär motorischer und somatosensorischer sowie piriformer Kortex, Hippokampus, primär somatosensorischer Kortex, barrel field). Besonders deutlich war die Markierung in den Hippokampusregionen CA1-CA3 zu erkennen. Eine Beeinflussung der α_4 -tragenden Zellen bezüglich Anzahl und Expressionsgrad sowie -intensität in den transgenen Tieren mit β -Amyloidplaques ist nicht zu erkennen (Abb. 4.15).

Der immunhistochemische Nachweis der α_7 nACh-Rezeptoren gelang in verschiedenen Bereichen des Hirns (zingulärer, primärer motorischer sowie somatosensorischer (barrel field), piriformer und temporaler Kortex, mediales Septum, Putamen, Hirnbalken, Hippokampus). Besonders zahlreich und prominent waren die Markierungen allerdings im Hippokampus (vor allem in der CA1-Region). In dieser Region sowie im primären motorischen Kortex waren auch die Zellfortsätze markiert (Abb. 4.16).

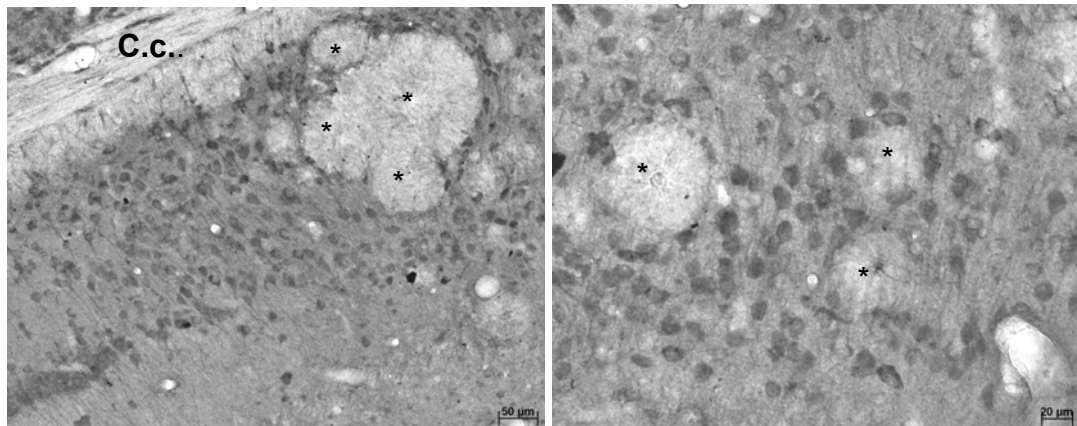


Abb. 4.15: Die immunhistochemische Markierung der α_4 nAChR im Hippokampus der CA1-Region; DAB-Nickel-Färbung, lichtmikroskopische Aufnahme (C. c.: Corpus callosum, Hirnbalken), 200-fache Vergrößerung (links) und 400-fache Vergrößerung (rechts). In unmittelbarer Nähe zu den β -Amyloidplaques ist keine Beeinflussung der Zellen durch die Plaques nachweisbar. Die Zentren der β -Amyloidplaques sind durch * gekennzeichnet.

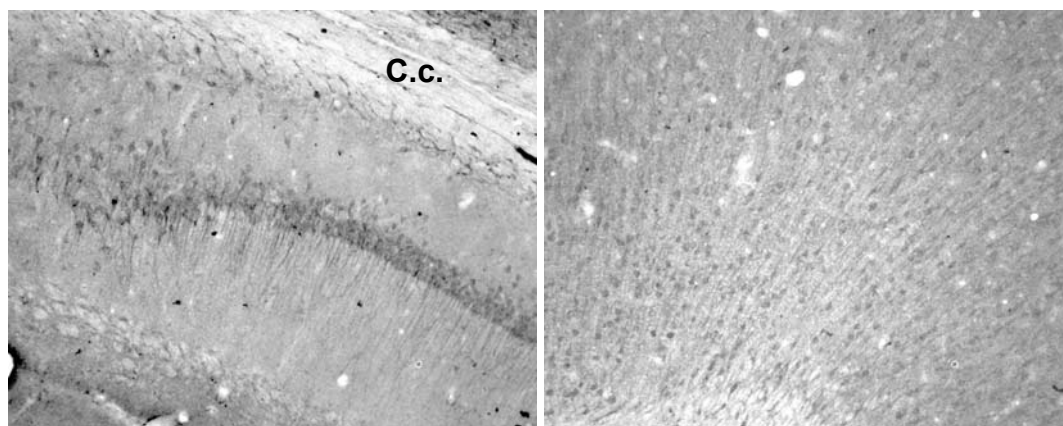


Abb. 4.16: Immunhistochemische Markierung der α_7 nAChR im Hippokampus (links) und im primären motorischen Kortex (rechts). DAB-Nickel-Färbung, 100-fache Vergrößerung, lichtmikroskopische Aufnahme (C. c.: Corpus callosum, Hirnbalken).

Mithilfe der immunhistochemischen Doppelmarkierung (Abb. 4.17) (Kap. 3.3.3.2) sollte festgestellt werden, ob die nikotinischen α_7 nACh-Rezeptoren auch von den reaktiven Astrozyten exprimiert werden, die sich in der unmittelbaren Umgebung der Plaques befinden. Seit kurzem gibt es Befunde, dass in Gehirnen von Alzheimer-patienten die α_7 -Expression in Astrozyten signifikant zunimmt, was als Kompensationsmechanismus für verringerte ACh-Freisetzung gedeutet wird (TEAKTONG et al. 2003). Außerdem sollte die Frage beantwortet werden, ob cholinerge Zellen, die α_7 -nikotinische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche aufweisen, in näherer Umgebung der β -Amyloidplaques degenerieren. Obwohl in diesen Mäusen kein massiver Neuronenverlust auftritt, gibt es Hinweise, dass in direkter Umgebung

der Plaques Neuronen zugrunde gehen. Die Doppelmarkierung erbrachte keine Beweise für das Vorhandensein von α_7 nAChR auf den Astrozyten, und auch eine Degeneration der α_7 nAChR-exprimierenden Zellen in der Nähe der Plaques war nicht zu erkennen

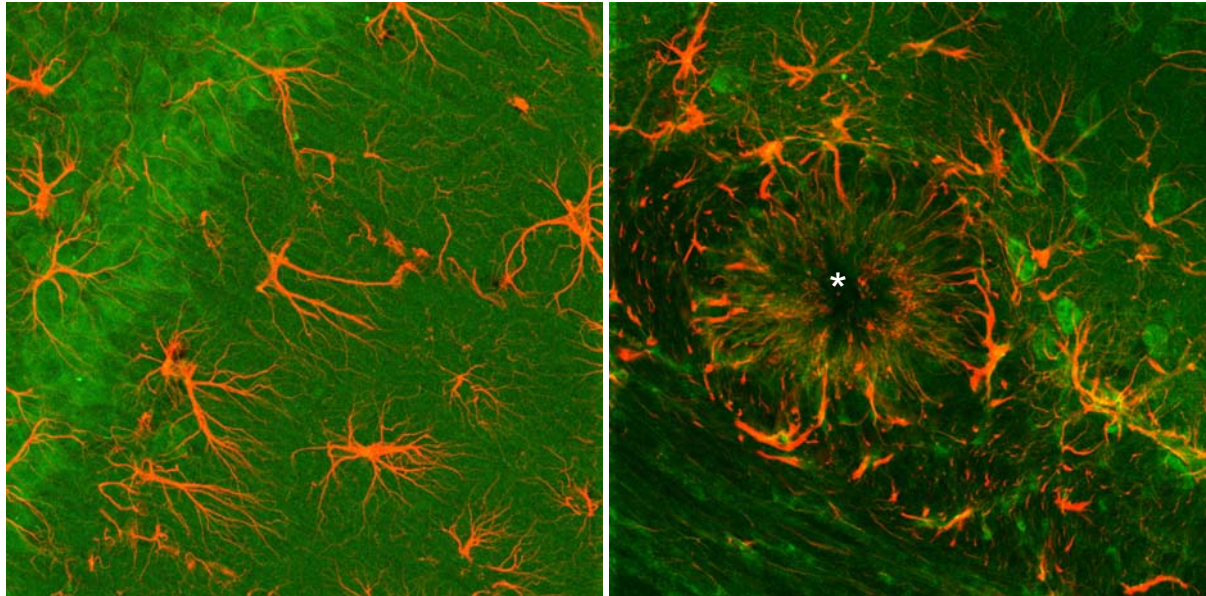


Abb. 4.17: Immunhistochemische Doppelmarkierung des nikotinischen ACh-Rezeptors α_7 (grün) und reaktiver Astrozyten (GFAP: Glia-fibrilläres saures Protein als Marker für Intermediärfilamente der Astroglia; rot) im Hippokampus der Tg2576 (21 Monate). Es ist keine Kolo-kalisation von reaktiven Astrozyten mit α_7 -Rezeptoren erkennbar (links). In der rechten Abbildung befindet sich zentral ein β -Amyloidplaque, umgeben von reaktiven Astrozyten. In unmittelbarer Nähe des Plaques sind α_7 nAChR-tragende Zellen sichtbar (grün). Das Zentrum des β -Amyloidplaques ist mit * gekennzeichnet. 600-fache Vergrößerung, Aufnahme mit konfokalem Laser-Scanning-Mikroskop.

Abb. 4.18 zeigt ein Überlagerungsbild einer Plaquemarkierung mit Thioflavin S (gelbgrün) (Kap. 3.3.3.3) einerseits und einer immunhistochemischen Markierung von reaktiven Astrozyten mittels GFAP (rot) und von α_7 nACh-Rezeptoren mittels Antikörper- und anschließender DAB-Nickel-Färbung (schwarz) (Kap. 3.3.3.2). Auch in dieser Abbildung ist gut erkennbar, dass die α_7 -rezeptortragenden Neuronen in der Nähe der Plaques keine Degenerationerscheinungen aufweisen.

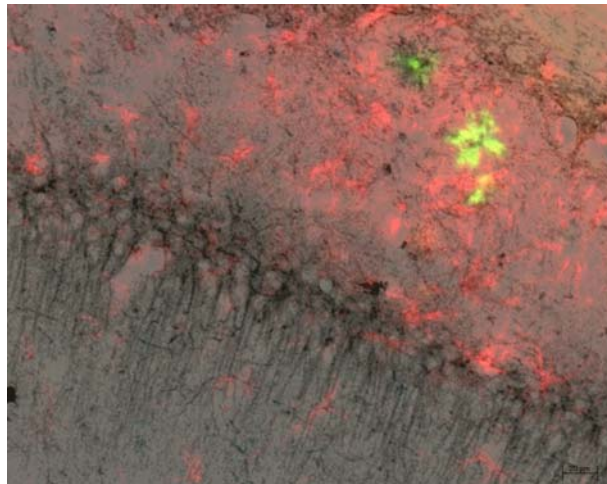


Abb. 4.18: Immunhistochemische Dreifachmarkierung des nikotinischen ACh-Rezeptors α_7 im Hippokampus (CA1-Region) der Tg2576-Maus (21 Monate), (DAB-Nickel; schwarz), reaktiven Astrozyten (GFAP; rot) und β -Amyloidplaques (Thioflavin S; grün). Die Astrozyten tragen keine α_7 -Rezeptoren und die Neuronen scheinen unbeeinflusst von der Plaqueablagerung. Lichtmikroskopische Aufnahme, 400-fache Vergrößerung.

4.2.6 Die *ex vivo* Markierung der AChE mittels [^{14}C]MP3A

Das Molekül N-[^{14}C]Methyl-3-Piperidyl-Azetat [^{14}C]MP3A ist ein Azetylcholinanalogon, welches für die Darstellung von Azetylcholinesterase im Hirn entwickelt wurde (IRIE et al. 1994). Die lipophile Ausgangssubstanz kann leicht durch die Blut-Hirn-Schranke passieren und wird im Hirn mithilfe der AChE zu einem hydrophilen Metaboliten (N-Methyl-3-Piperidinol) umgewandelt, der aufgrund dieser Eigenschaft in Hirnzellen akkumuliert und dort nachweisbar ist. In Hirnregionen mit hoher Akkumulationsrate radioaktiver Reaktionsprodukte, was durch eine deutlichere Schwärzung des Films in diesen Regionen erkennbar ist, kann die Anwesenheit hoher Konzentrationen des cholinergen Enzyms angenommen werden. Die *in vivo* Akkumulation des [^{14}C]MP3A wurde durch eine immunhistochemische Markierung nach ANDRÄ und LOJDA (1986) an entsprechenden Schnitten im gleichen Abstand vom Bregma (-3,28 mm) verifiziert. Trotz verschiedener Optimierungsversuche konnte mit dem genannten Radioliganden keine spezifische Radioaktivitätsverteilung erzielt werden, die mit dem bekannten Enzymmuster korreliert (Abb. 4.19).

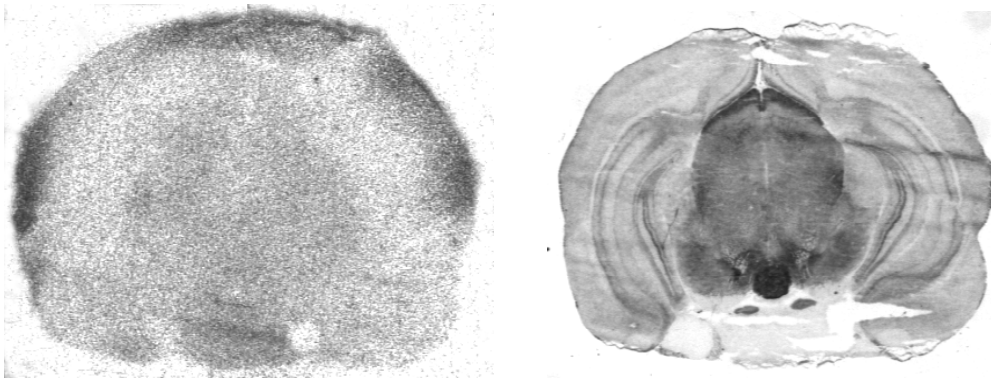


Abb. 4.19: Repräsentative Abbildungen zum Nachweis der AChE-Aktivität, links durch [^{14}C]MP3A *ex vivo* Autoradiografie, rechts mithilfe der AChE-Histochemie nach ANDRÄ u. LOJDA, 1986.

4.3 Das adrenerge System in Tg2576

Eine Reihe von Untersuchungen weist darauf hin, dass die zerebralen Veränderungen bei Alzheimerpatienten nicht nur das cholinerge, sondern auch andere Transmittersysteme betreffen. Um zu prüfen, ob es Unterschiede zwischen transgenen und nicht transgenen Mäusen hinsichtlich der adrenergen Transmission gibt, wurde in dieser Arbeit die Verteilung von Adrenozeptoren mittels quantitativer Rezeptorautoradiografie (Kap. 3.3.1) in Tg2576 im Vergleich zu nicht transgenen Wurfgeschwistern erfasst.

4.3.1 Die α_1 -Adrenozeptoren

[^3H]Prazosin, eine bekannte Substanz aus der Gruppe der spezifischen α_1 -Rezeptorblocker, diente zur Darstellung der α_1 -Adrenozeptoren an den Hirnschnitten der untersuchten Tiere (Abb. 4.23). Die Dichte der α_1 -Adrenozeptoren zeigte regionale Variationen. So konnten im primären motorischen Kortex vergleichsweise höhere Bindungsdaten ermittelt werden, während diese im Hippokampus besonders niedrig waren.

Bei den jünderen (fünf Monate) Mäusen konnten in den untersuchten Hirnregionen keine signifikanten Veränderungen zwischen transgenen und Kontrolltieren festgestellt werden. Bei den 17 Monate alten Mäusen (Abb. 4.20) konnte tendenziell eine Erhöhung der Ligandbindungswerte von den transgenen Tieren, im Vergleich mit den nicht transgenen Geschwistern, die im mittleren piriformen Kortex (Abstand vom Bregma: +0,4 bis -1,0 mm) signifikant war ($p \leq 0,05$), nachgewiesen werden.

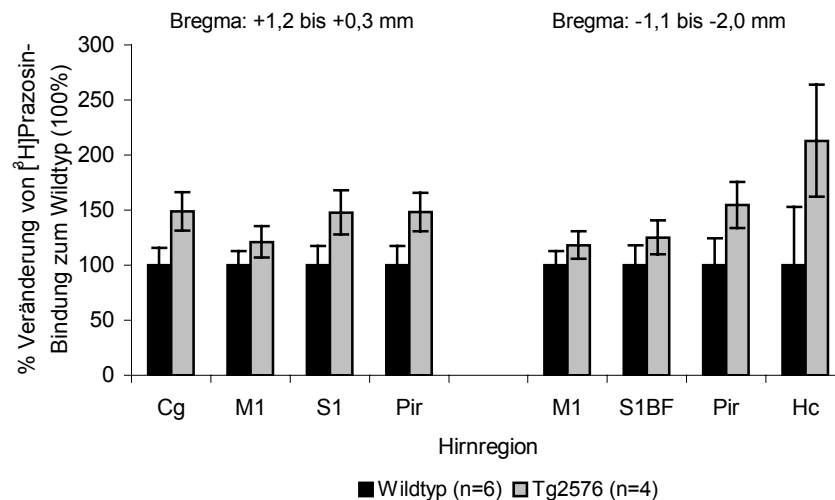


Abb. 4.20: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Prazosin-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren, in Prozent Veränderung im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Rezeptorbindung.

Altersabhängig nahmen die α_1 -Adrenozeptor-Bindungsstellen sowohl bei den transgenen, als auch bei den nicht transgenen Tieren ab. Bei den Kontrolltieren lag die Abnahme zwischen 59 und 67%, im Hippokampus sogar bei 83%. Für die Tg2576-Mäuse betrug die altersabhängige Abnahme zwischen 35 und 52%, am deutlichsten war sie auch hier im Hippokampus mit 63% (Abb. 21).

4.3.2 Die α_2 - Adrenozeptoren

Die Verteilung der α_2 -Adrenozeptoren im Mäusehirn (Abb. 4.23) wurde mittels [^3H]Rauwolscin, einem selektiven α_2 -Adrenozeptorantagonisten, untersucht und ergab eine relativ gleichmäßige Verteilung in allen untersuchten Regionen. Bei den fünf Monate alten Tieren wurden hinsichtlich der Bindungsspiegel keine Unterschiede zwischen der Rezeptordichte von transgenen Tieren und nicht transgenen Wurfgeschwistern ermittelt. Die 17 Monate alten Mäuse zeigten in den anterioren Hirnregionen eine signifikante Erhöhung ($p \leq 0,05$) der Rezeptordichte um 21% (zingulärer Kortex) bzw. um 48% (piriformer Kortex) bei den transgenen Tieren, während diese signifikanten Veränderungen im posterioren Kortex nicht mehr nachweisbar waren (Abb. 4.22).

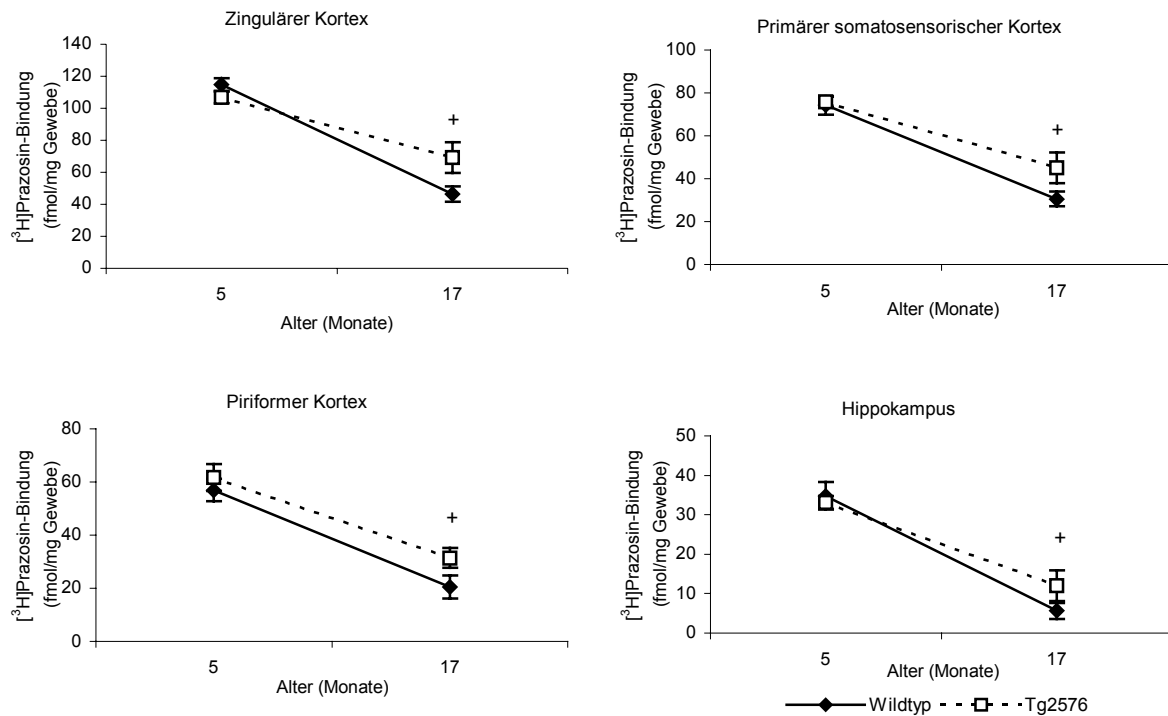


Abb. 4.21: Grafische Darstellung der altersabhängigen Unterschiede in der $[^3\text{H}]$ Prazosin-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von Tg2576- und Kontrollmäusen in fmol pro mg Gewebe. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Rezeptorbindung.

Rechts: Bregma: +1,2 bis +0,3 mm, links: Bregma: -1,1 bis -2,0 mm.

$^+p \leq 0,05$: verglichen mit 5 Monate alten transgenen und nicht transgenen Tieren

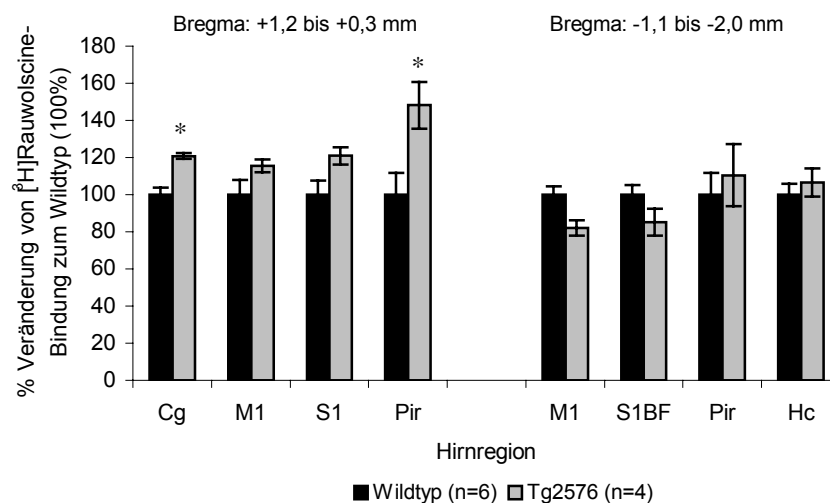


Abb. 4.22: Grafische Darstellung der Quantifizierung der $[^3\text{H}]$ Rauwolscine-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren, in Prozent Veränderung im Vergleich zu nicht transgenen Geschwister Tieren. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Rezeptorbindung. ($^*p \leq 0,05$)

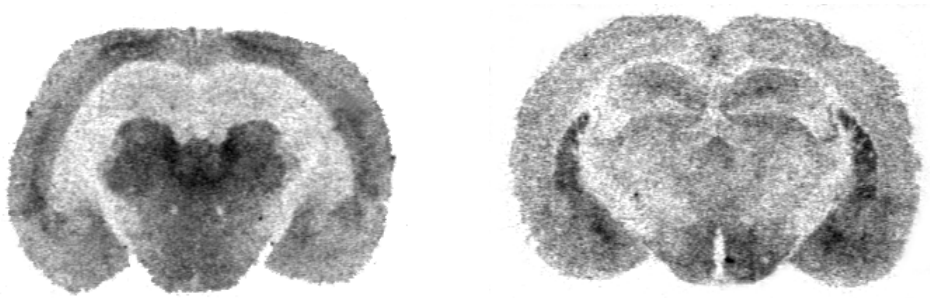


Abb. 4.23: Repräsentative Darstellung der autoradiografisch ermittelten [^3H]Prazosin-Bindungsstellen (α_1 -Adrenozeptor, links) bzw. der [^3H]Rauwolscine-Bindungsstellen (α_2 -Adrenozeptor, rechts) im Hirn der Maus.

Eine signifikante ($p \leq 0,05$) altersabhängige Zunahme der α_2 -Adrenozeptor-Bindungsstellen zeigen im anterioren Kortexbereich lediglich die transgenen Tiere (Abb. 4.24). Hier nehmen die Bindungsstellen um 72% (primärer motorischer Kortex), um 45% (primärer somatosensorischer Kortex) und um 113% (piriformer Kortex) zu. In den mittleren und posterioren Hirnebenen betrifft die Zunahme der Bindungsstellen sowohl die transgenen Tiere (Zunahmen um 110% im primären motorischen Kortex, um 70% im posterioren primären somatosensorischen Kortex (barrel field), um 81% bzw. 117% im piriformen Kortex und um 69% im Hippokampus) als auch die nicht transgenen Tiere (Zunahmen um 86% im posterioren primären motorischen Kortex, um 65% bzw 81% im primären somatosensorischen Kortex (barrel field), um 51% im posterioren piriformen Kortex und um 160% im Hippokampus).

4.3.3 Die β -Adrenozeptoren

[^3H]Dihydroalprenolol (DHA) als β -Adrenozeptorantagonist diente zur Untersuchung des möglichen Einflusses der genetischen Veränderung der transgenen Mäuse auf die β -Adrenozeptoren (Abb. 4.27). Die Verteilung der Rezeptordichte in den untersuchten Hirnregionen zeigte kaum regionale Unterschiede. Bei den jüngeren Tieren war eine leichte Reduktion der Ligandbindungsspiegel um 20 bis 30% bei den transgenen Tieren, verglichen mit nicht transgenen Geschwistern, in allen untersuchten Regionen sichtbar (Abb. 4.25), statistisch signifikant ($p \leq 0,05$) war diese jedoch nur im posterioren piriformen Kortex (49%).

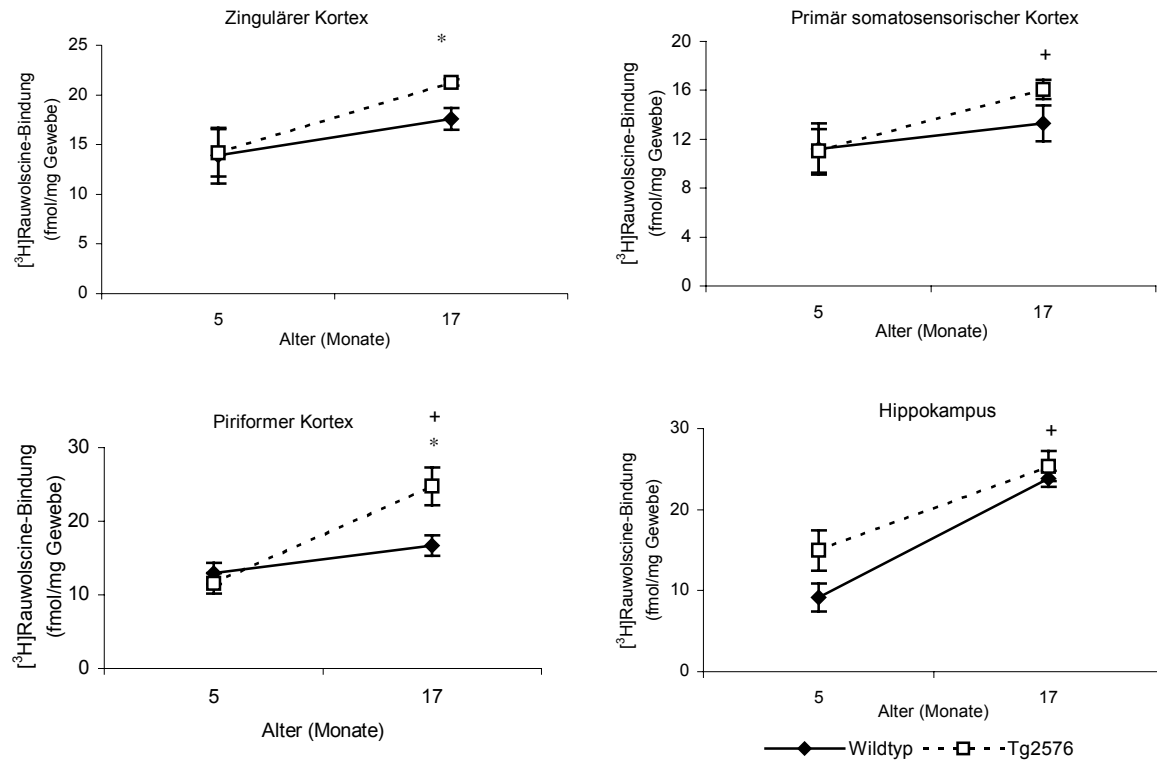


Abb. 4.24: Grafische Darstellung der altersabhängigen Unterschiede in der [^3H]Rauwolschine-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von Tg2576- und Kontrollmäusen in fmol pro mg Gewebe. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Rezeptorbindung.

Rechts: Bregma: +1,2 bis +0,3 mm, links: Bregma: -1,1 bis -2,0 mm.

* $p \leq 0,05$: verglichen mit nicht transgenen Geschwistertieren

+ $p \leq 0,05$: verglichen mit 5 Monate alten transgenen Tieren

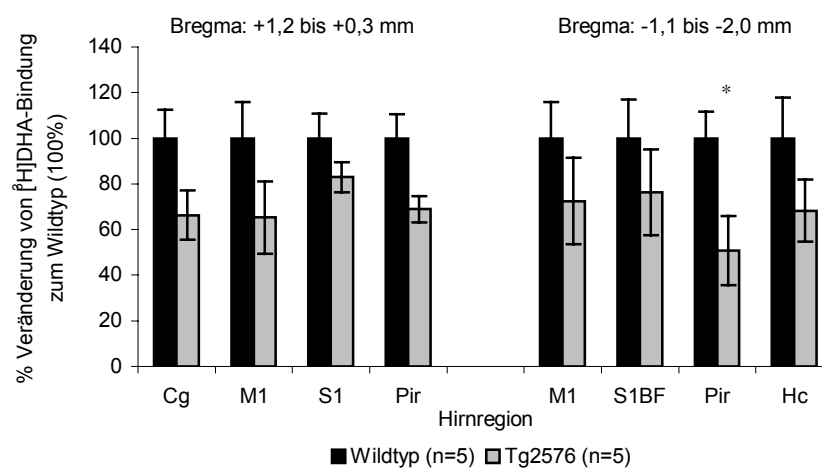


Abb. 4.25: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Dihydroalprenolol-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 5 Monate alten transgenen Tieren, in Prozent Veränderung im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Rezeptorbindung. (* $p \leq 0,05$)

Eine solche gleichmäßige Verringerung der Bindungsspiegel konnte bei den 17 Monate alten Mäusen nicht mehr gefunden werden. Hier war in den anterioren Hirnregionen der Tg2576-Mäuse die Ligandbindung zwar erniedrigt, im primären motorischen Kortex mit 17% auch signifikant, jedoch setzte sich dieser Trend in den posterioren Hirnregionen nicht weiter fort. Dort konnten ebenso hohe bzw. höhere Bindungsspiegel in den transgenen Tieren, verglichen mit Kontrolltieren, beobachtet werden. Im piriformen Kortex lag die allerdings statistisch nicht signifikante Erhöhung des Ligandbindungsspiegels bei 20% (Abb. 4.26).

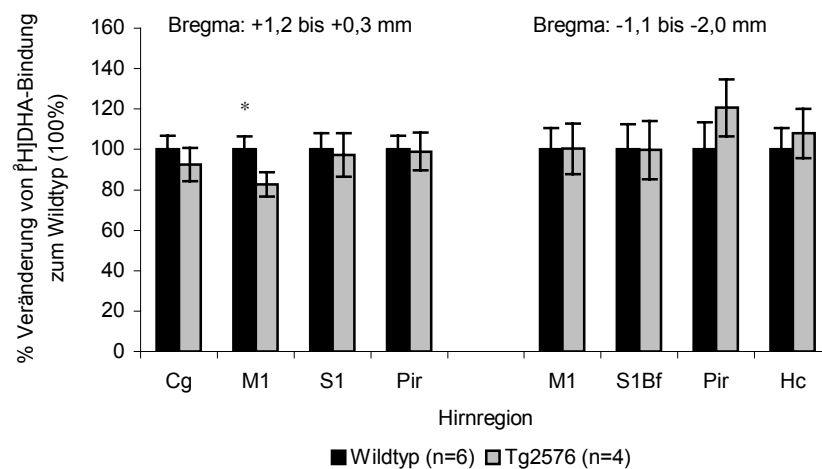


Abb. 4.26: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Dihydroalprenolol-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren, in Prozent Veränderung zu nicht transgenen Geschwistertieren. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Rezeptorbindung. (* $p \leq 0,05$)

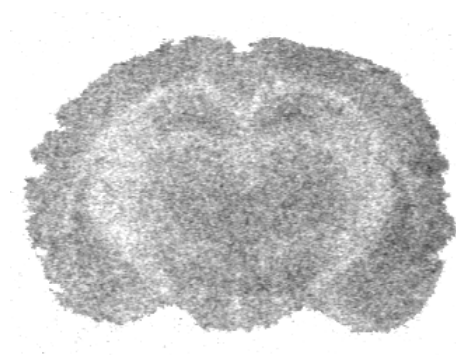


Abb. 4.27: Repräsentative Darstellung der autoradiografisch ermittelten [^3H]DHA-Bindungsstellen (β -Adrenozeptor) im Hirn der Maus.

Die altersabhängige β -Adrenozeptor-Bindungsstellenzunahme (Abb. 4.28) betrifft lediglich die transgenen Tiere. Signifikante Erhöhungen ($p \leq 0,05$) der Ligandbindungsstellen konnten sowohl im anterioren zingulären Kortex (51%), im piriformen (55%), als auch im posterioren piriformen Kortex (um 118%) sowie im Hippokampus (um 128%) beobachtet werden.

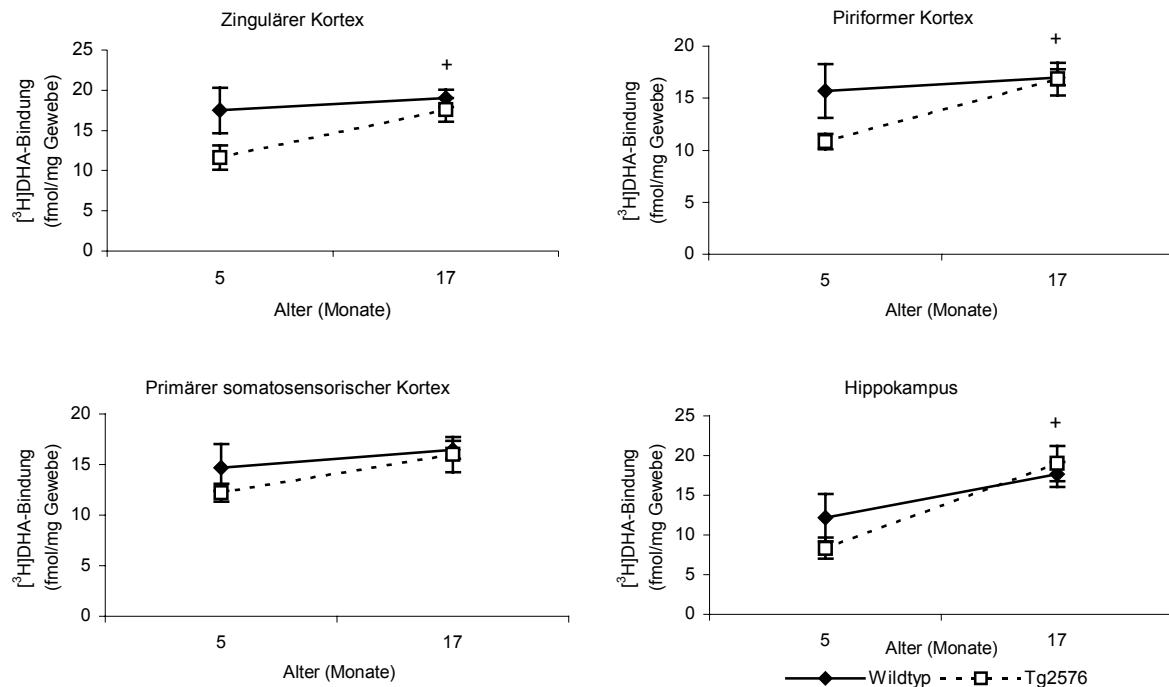


Abb. 4.28: Grafische Darstellung der altersabhängigen Unterschiede in der $[^3\text{H}]$ Dihydroalprenolol-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von Tg2576- und Kontrollmäusen in fmol pro mg Gewebe. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Rezeptorbindung.

Rechts: Bregma: +1,2 bis +0,3 mm, links: Bregma: -1,1 bis -2,0 mm.

⁺ $p \leq 0,05$: verglichen mit 5 Monate alten transgenen Tieren.

4.4 Der Energiestoffwechsel

4.4.1 Der Glukosestoffwechsel

Da bei der Alzheimerschen Erkrankung neben den Veränderungen der Neurotransmittersysteme auch Defizite beim kortikalen Glukosestoffwechsel und den Glukosetransportern festgestellt wurden, sollte am transgenen Tiermodell geprüft werden, inwieweit der Glukosestoffwechsel durch die humane APP-Isoform mit schwedischer Mutation im Mausgenom beeinflusst wird. $[^3\text{H}]$ Cytochalasin-B wurde als Radioligand eingesetzt (Kap. 3.3.1), um die Gesamtpopulation der kortikalen Glukosetransporter im Mäusehirn zu erfassen (Abb. 4.34). Eine besonders hohe Ligandbindung war sowohl bei den fünf Monate alten als auch bei den 17 Monate alten Tieren im posterioren piriformen Kortex sowie im Hippokampus zu verzeichnen. Bei den fünf Monate alten Mäusen wurde im anterioren Kortex eine um 36% (zingulärer und primär motorischer Kortex) bzw. 40% (primär somatosensorischer Kortex) statistisch nicht signifikant verringerte Ligandbindung bei den transgenen

Tieren im Vergleich zu ihren nicht transgenen Geschwistern festgestellt. Im posterioren Teil wurde keine signifikante Änderung beobachtet.

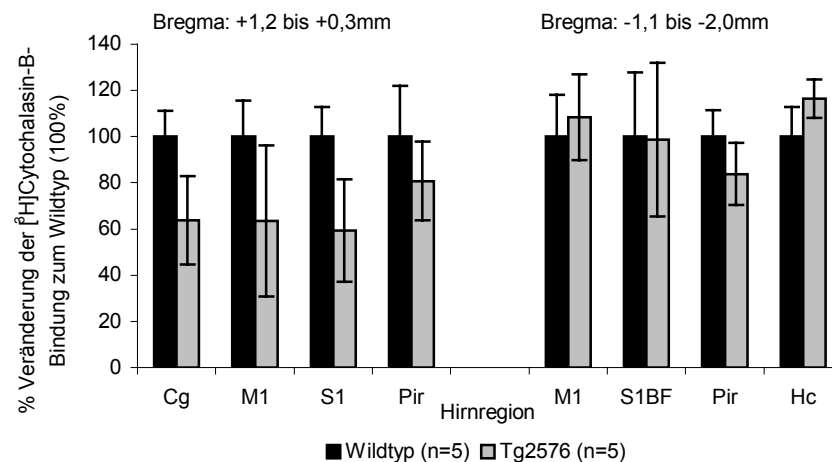


Abb. 4.29: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Cytochalasin-B-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 5 Monate alten transgenen Tieren, in Prozent Veränderung im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Rezeptorbindung.

Bei den 17 Monate alten Mäusen lässt sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den [^3H]Cytochalasin-B-Ligandbindungsspiegeln der Tg2576-Tiere und ihren nicht transgenen Wurfgeschwistern feststellen.

Die Veränderungen zwischen den beiden Altersstufen stellen sich in den verschiedenen Hirnregionen nicht uniform dar. So kann im anterioren Kortex bei den transgenen Tieren ein Anstieg der Bindungsspiegel für die Gesamtheit der Glukosetransporter mit zunehmendem Alter beobachtet werden, während die nicht transgenen Geschwistertiere eine Abnahme derselben aufweisen. Hierbei ist interessant, dass die Anzahl der Bindungsstellen bei den transgenen Tieren zunächst deutlich geringer ist als bei den Kontrolltieren. Im Verlauf der Entwicklung nehmen die Bindungsstellen bei den transgenen Tieren schneller zu als bei den Kontrollen, um im Alter von 17 Monaten das Defizit ausgeglichen bzw. sogar überschritten zu haben. In den posterioren Hirngebieten ist eine solche Entwicklung nicht vorhanden. Hier wiesen sowohl die transgenen als auch die Kontrolltiere einen Anstieg der Bindungsspiegel für [^3H]Cytochalasin-B auf (Abb. 4.30).

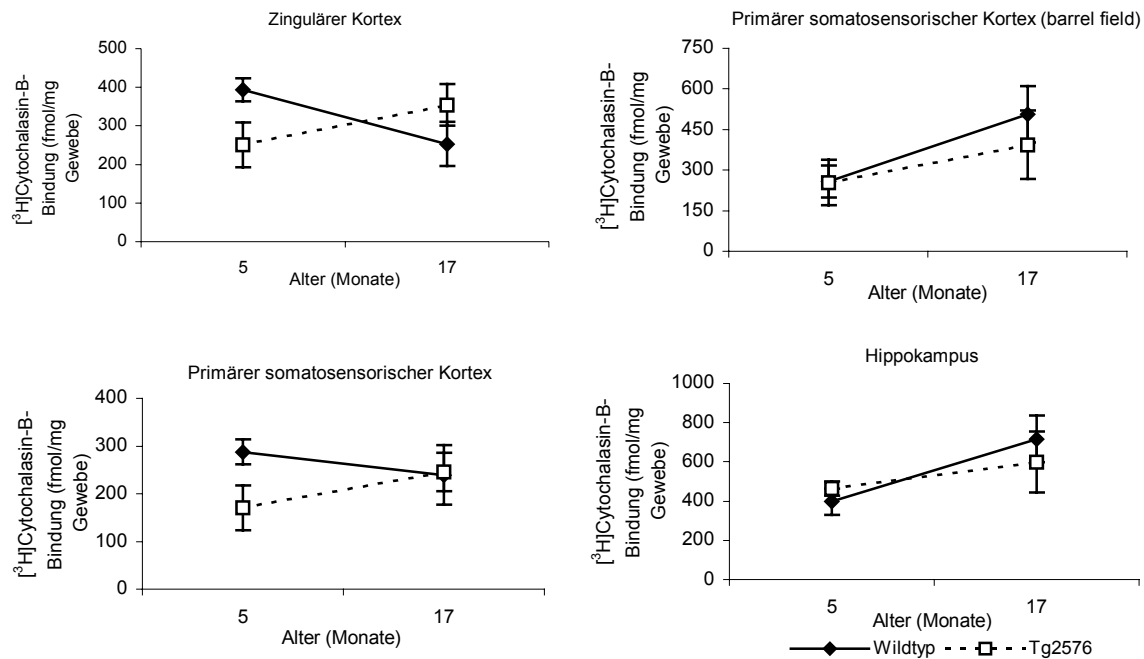


Abb. 4.30: Grafische Darstellung der altersabhängigen Unterschiede in der $[^3\text{H}]$ Cytochalasin-B-Bindung als Marker für die Gesamtheit der Glukosetransporter in ausgewählten Hirnregionen von Tg2576- und Kontrollmäusen in fmol pro mg Gewebe. Die Fehlerbalken repräsentieren die Standardabweichung des Mittelwerts (S_d) der gemessenen Rezeptorbindung.

Rechts: Bregma: +1,2 bis +0,3 mm, links: Bregma: -1,1 bis -2,0 mm.

4.4.2 Die immunhistochemische Darstellung der Kapillaren in der Nähe der β -Amyloidplaques

Da der Glukosetransporter 1 vor allem in Kapillarendothelien und an Astrozytenfüßchen lokalisiert ist, wurde er benutzt, um die Hirnkapillaren darzustellen (Kap. 3.3.3.2). Dabei sollte festgestellt werden, ob die Plaqueausbildung einen Einfluss auf die Hirndurchblutung ausübt, das heißt, ob beispielsweise die Kapillardichte in unmittelbarer Nähe dieser Plaqueablagerungen modifiziert wird. Die visuelle Inspektion im Lichtmikroskop (Abb. 4.31) lässt keine eindeutige Aussage über den Einfluss der β -Amyloidplaques auf die Dichte der Kapillaren zu. Durch die Quantifizierung mittels bildanalytischer Methoden jedoch konnte ein Unterschied (Abb. 4.32) in der Kapillardichte zwischen der Ringfläche, die näher am Plaque gelegen ist (R4) und der, die weiter entfernt liegt (R7), festgestellt werden (Kap. 3.3.4). Generell konnte eine geringfügig niedrigere Kapillardichte direkt um die β -Amyloidablagerungen (R4) festgestellt werden, verglichen mit den Gebieten die weiter vom Plaque entfernt lagen (R7). Im primären motorischen Kortex betrug die

Erhöhung 27%, im primär somatosensorischen Kortex 47% und im piriformen Kortex 13% (Abb. 4.32).

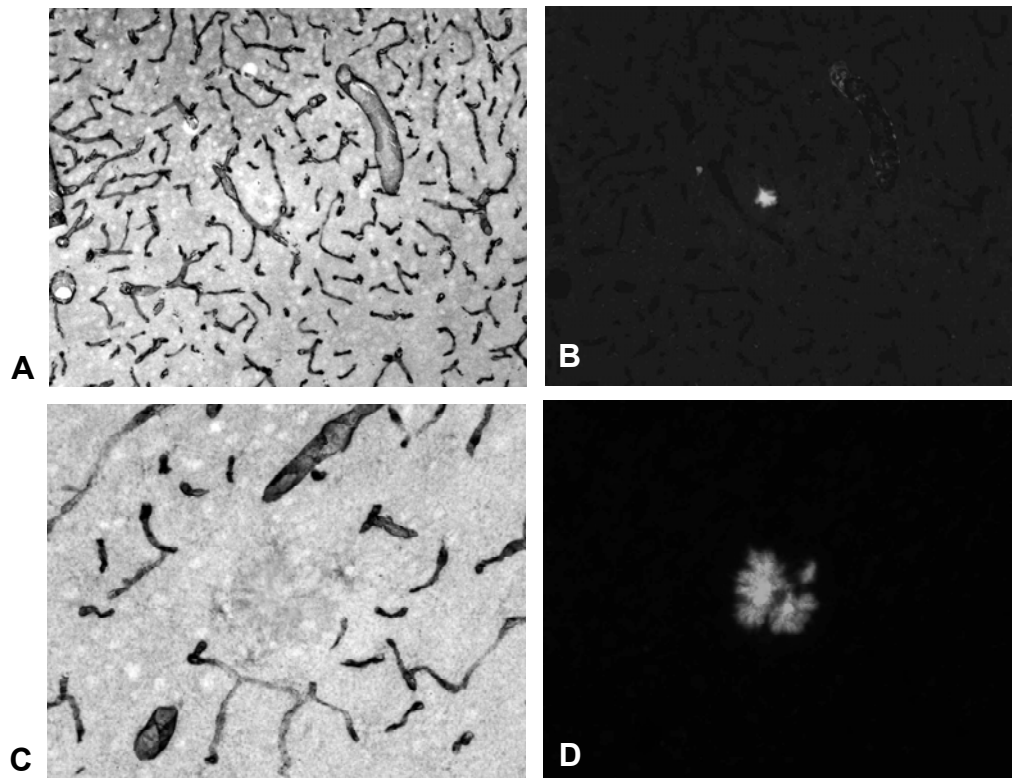


Abb. 4.31: Repräsentatives Beispiel der immunhistochemischen GLUT1-Markierung zur Sichtbarmachung der Kapillaren im primären motorischen Kortex (A, B: 200-fache Vergrößerung) bzw. primären somatosensorischen Kortex (C, D: 400-fache Vergrößerung), DAB-Nickel-Färbung, lichtmikroskopische Aufnahme. B und D bezeichnen jeweils die korrespondierende Thioflavin-S-Färbung zur Darstellung der β -Amyloidplaques.

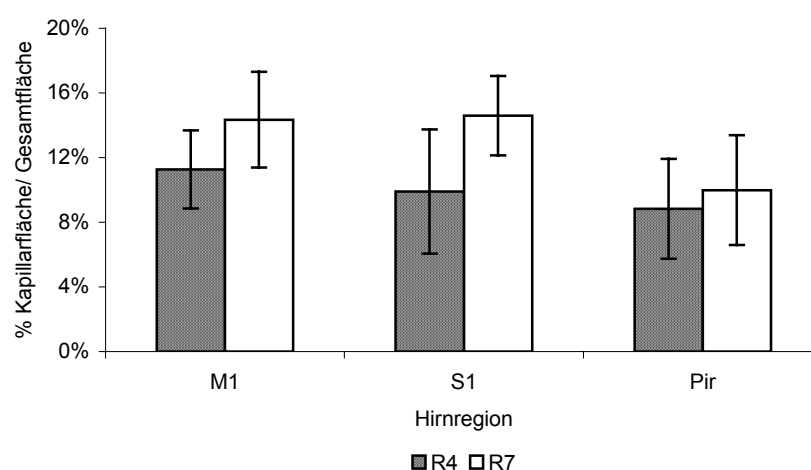


Abb. 4.32: Darstellung der Quantifizierung der GLUT1-Dichte \pm Standardfehler als Marker für die Kapillardichte im Hirn von 21 Monate alten transgenen Mäusen Tg2576 ($n=2$) in definierten Abständen vom β -Amyloidplaque. R4 beschreibt einen Ring, der dem vierfachen Radius des entsprechenden Plaques entspricht. R7 beschreibt den Ring, der dem siebenfachen Radius des Plaques, abzüglich R4 entspricht (Kap. 3.3.4).

Bei der immunhistochemischen Fluoreszenzdoppelmarkierung (Kap. 3.3.3.2) von Kapillaren und Plaques konnten keine Kapillaren entdeckt werden, die direkt mit den Plaques in Beziehung standen oder diese penetrierten (Abb. 4.33).

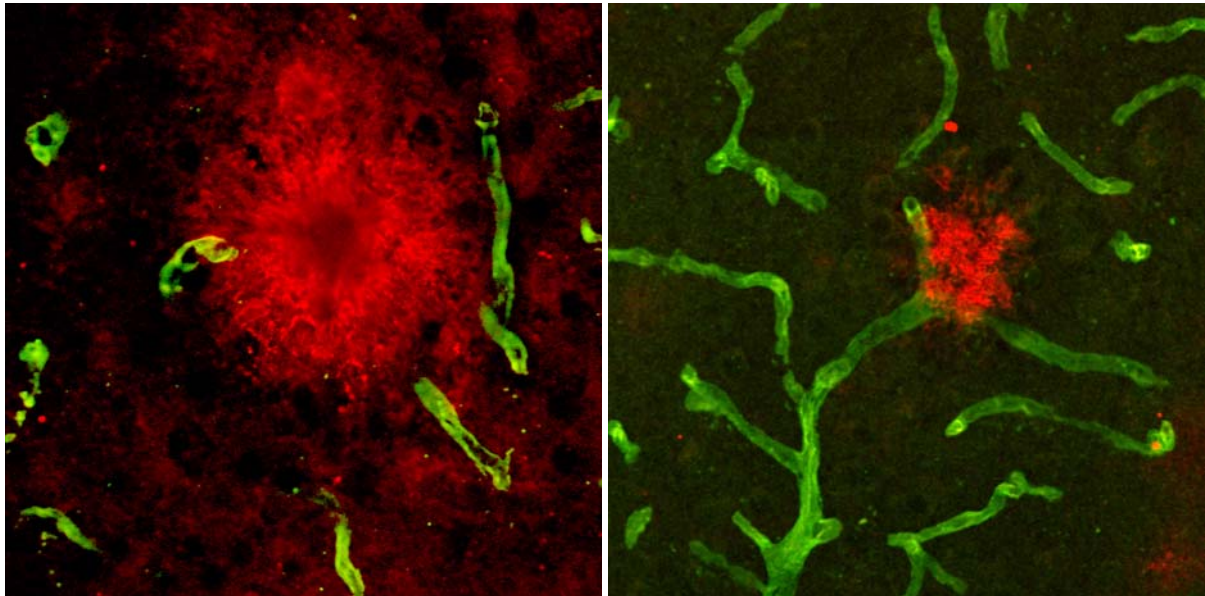


Abb. 4.33: Repräsentative Beispiele der immunhistochemischen Doppelmarkierung der β -Amyloidplaques (rot) und der umliegenden Kapillaren (grün). Dargestellt sind Ausschnitte aus dem primär motorischen Kortex einer Tg2576-Maus (21 Monate). Erkennbar ist, dass die Kapillaren in keiner direkten Beziehung mit den Plaques stehen. Aufnahme mit dem konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop, 600-fache Vergrößerung.

4.4.3 Der Sulfonylharnstoffrezeptor

Sulfonylharnstoffe haben bei der Regulation der Insulinfreisetzung und Glukoseverwertung eine wichtige Funktion und sind somit an der Glukoseaufnahme beteiligt. Ihre Rezeptoren wurden auch im Gehirn nachgewiesen. Zur autoradiografischen Erfassung der Sulfonylharnstoffrezeptoren (Kap. 3.3.1) wurde der Ligand [^3H]Glibenclamid benutzt. Seine Verteilung in Kortex und Hippokampus der Mäuse zeigte kaum regionale Unterschiede (Abb. 4.34). Es konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen der Ligandbindung von transgenen und nicht transgenen Geschwistertieren, weder innerhalb der Population der fünf Monate alten Tiere, noch innerhalb der der 17-monatigen Mäuse festgestellt werden.

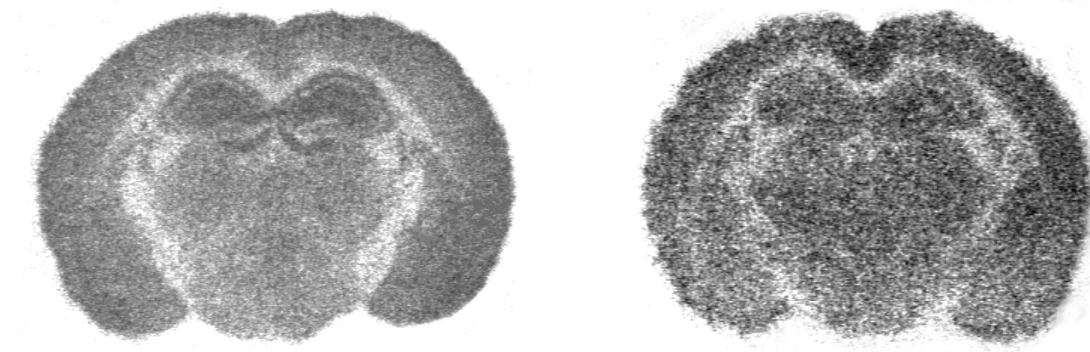


Abb. 4.34: Repräsentative Abbildung der Autoradiografien für die Radioliganden [^3H]Cytochalasin-B (links) bzw. [^3H]Glibenclamid (rechts).

4.5 Markierung der β -Amyloidplaques mit ^{131}I -Pentapeptid

So genannte β -Faltblatt-strukturbrechende Peptide, aus vier bis elf Aminosäuren bestehende synthetische Peptide homolog zur zentralen A β -Region, sollen *in vitro* eine hohe Bindungsaffinität an aggregiertes β -Amyloid und antiaggregierende Eigenschaften auf dasselbe haben.

Eine Aufgabe dieser Arbeit bestand darin, das vorliegende Peptid aufgrund seiner hohen Bindungsaffinität an aggregiertes β -Amyloid auf seine Eignung für diagnostische Zwecke zu testen. Eine hoch affine spezifische Bindung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Abb. 4.36). Es zeigte sich, dass sich das Peptid auch an andere, nicht amyloidogene Strukturen anlagerte. Dadurch wurde im Hirnschnitt der transgenen Maus eine deutlich höhere Plaquebeladung als tatsächlich vorhanden suggeriert, und auch in der Negativkontrolle regional eine erhöhte Radioaktivität gemessen.

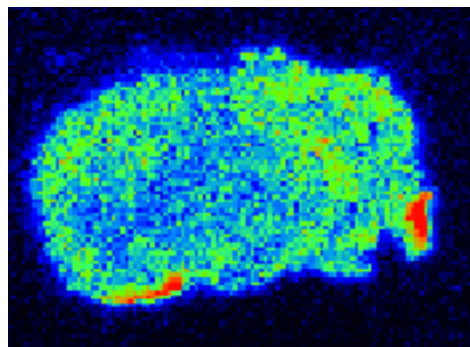


Abb. 4.36: Repräsentative Darstellung eines *in vitro* Markierungsversuchs mit dem ^{131}I -Pentapeptid in einem Frontalschnitt durch das Hirn einer transgenen Maus (Tg2576). Die Abbildung zeigt eine deutlich über die Plaquebeladung hinausgehende Markierung. Blaue Regionen weisen die geringste und rote Regionen die höchste ^{131}I -Pentapeptid-Bindung auf.

5 Diskussion

5.1 Methodische Betrachtungen

Die hauptsächlich in dieser Arbeit verwendeten Methoden sollen zunächst kurz diskutiert werden, um die Vorzüge und Nachteile zu erläutern. Dabei soll auch auf mögliche Fehlerquellen hingewiesen werden. Auf Besonderheiten, die einzelnen Rezeptortypen betreffend, wird an gegebener Stelle eingegangen.

Die Durchführung biochemischer Untersuchungen an Organismen bedient sich grundsätzlich dreier verschiedener Methoden: *in vitro*-, *ex vivo*- und *in vivo* Versuche. *In vitro* Tests werden außerhalb der normalen physiologischen Umwelt durchgeführt, wobei lediglich einige wenige Parameter, z. B. der pH-Wert, konstant bzw. im physiologischen Bereich gehalten werden. Sie dienen als Screeningmethoden und gehen meist den beiden anderen Methoden voraus. *Ex vivo* Versuche werden innerhalb der normalen physiologischen Umwelt durchgeführt, jedoch geschieht die Auswertung des Experiments außerhalb unter artifiziellen Bedingungen. Bei der *in vivo* Methode werden sowohl die Untersuchungen als auch deren Auswertung innerhalb der normalen physiologischen Umgebung durchgeführt.

In der vorliegenden Arbeit wurden neben der *ex vivo* Methode hauptsächlich *in vitro* Untersuchungen durchgeführt. Ihr gleichzeitiger Vor- und Nachteil ist, dass ein bestimmter Parameter unabhängig von anderen Faktoren und Einflüssen auf seinen Effekt am Gewebe untersucht werden kann. So wurde die Radioligandbindung an verschiedene Rezeptoren am Hirnschnitt getestet, ohne dass eine Konkurrenz mit anderen Rezeptoragonisten oder -antagonisten zu berücksichtigen war. Dadurch können Rückschlüsse auf die Gesamtpopulation dieser Rezeptoren und ihre mögliche Beeinflussung in den genetisch veränderten Mäusen gezogen werden. Eine Ableitung über das Verhalten des Liganden unter *in vivo* Bedingungen ist mit dieser Untersuchung jedoch nicht möglich. Die in dieser Arbeit durchgeführte *ex vivo* Untersuchung ist als Behelf mangels geeigneter Detektionsverfahren am lebenden Organismus zu betrachten. Die dafür verwendete Testsubstanz wurde in den lebenden Organismus injiziert, und nach entsprechender Zeit wurde das Tier getötet, um das Gehirn zu entnehmen, damit mögliche Effekte untersucht werden konnten. Hierbei ist zu beachten, dass postmortale Veränderungen die eigentliche Wirkung verfälschen können.

Eine seit vielen Jahrzehnten etablierte *in vitro* Methode ist die Rezeptorautoradiografie. Sie dient zur Darstellung von Rezeptormolekülen in Gewebeschnitten. Die Schnitte werden mit einem radioaktiv markierten Liganden inkubiert, der möglichst selektiv an die darzustellende Struktur bindet. Die Bindungsstellen können durch den radioaktiven Marker anschließend auf einem radiosensitiven Film abgebildet werden. Die Anlagerung des Liganden an die unspezifischen Bindungsstellen wird durch einen Überschuss des Liganden oder eines anderen potenten Rezeptorblockers bzw. -agonisten, der nicht radioaktiv markiert ist, ermittelt und von den spezifischen Bindungsspiegeln subtrahiert. Desgleichen müssen die Bindungen endogener Liganden ausgeschlossen werden, was durch Auswaschen in einer geeigneten Pufferlösung geschieht. Vorteilhaft ist bei dieser Methode, dass eine exakte regionale Zuordnung der Ligandbindungen zur Hirnregion ermöglicht wird, was beispielsweise bei Ligandbindungsstudien, die an Hirnhomogenaten durchgeführt werden, nicht möglich ist. Allerdings stehen die Ergebnisse, bedingt durch zum Teil lange Expositionszeiten der Filme, nicht sofort zur Verfügung, und es wird eine spezielle Auswertesoftware benötigt. Weiterhin sind Gewebestandards mitzuführen, damit die gemessenen Graustufen auf den radiosensitiven Filmen einer bestimmten Stoffmenge an gebundenem Radioliganden zugeordnet werden können. In dieser Arbeit wurden keine Vorarbeiten zur Bindungskinetik durchgeführt, da diese bereits aus früheren Untersuchungen der Arbeitsgruppe vorlagen. Weiterhin wurde lediglich mit einer Ligandkonzentration gearbeitet, sodass bei Veränderungen in der Radioligand-bindung nicht zwischen Änderungen der Rezeptoranzahl und -affinität unterschieden werden konnte.

Eine weitere in dieser Arbeit angewandte Technik ist die der *in situ* Hybridisierung. Sie erlaubt den Nachweis spezifischer Nukleinsäuren am Hirnschnitt, unter Ausnutzung ihrer Eigenschaft, sich mit so genannten komplementären Bereichen anderer DNA- und RNA-Stränge zu verbinden. Durch die Verwendung komplementärer nicht radioaktiv oder radioaktiv markierter Sonden kann die entsprechende RNA erfasst werden mit dem Vorteil, dass eine positive Reaktion im Gewebe wiederum in Bezug zur Morphologie gesetzt werden kann. Eine positive Reaktion kann in gewissem Umfang auch Rückschlüsse über die exprimierten Proteine zulassen. Die Sonden weisen eine unterschiedliche Länge auf. So penetrieren kurze Nukleinsäuresequenzen, auch als Oligonukleotide bezeichnet und bestehend aus ca. 20 bis 40 Basen, besser in die Zellen, während längere

Sequenzen eine höhere Spezifität aufweisen. Weiterhin haben kurze Sequenzen den Vorteil einer hohen Stabilität bei gleichzeitiger Vermeidung repetitiver Sequenzen. In dieser Arbeit wurden Oligonukleotide verwendet, die für die Ratte beschrieben sind (BONNER et al. 1987) und deren Sequenzhomologie, verglichen mit der der Maus, annähernd 100% identisch war. Das Hybridisierungsbild, welches in der Maus erzielt wurde, wurde mit dem der Ratte verglichen und nur ausgewertet, wenn es mit diesem identisch war. Die Sonden waren radioaktiv markiert, was den Nachteil der eingeschränkten Verwendungsdauer der Sonden und der Entstehung radioaktiven Abfalls mit sich brachte. Jedoch ist diese Methode sensitiver und erlaubt eine semiquantitative Auswertung. Dabei wurde in Kauf genommen, dass eine zelluläre Auflösung der Strukturen, wie bei der nichtradioaktiven *in situ* Hybridisierung, unmöglich ist.

Die Technik der immunhistochemischen Markierung basiert auf dem Prinzip der spezifischen Bindung eines Antikörpers an das darzustellende Antigen und der anschließenden Sichtbarmachung, unter Umständen mit einer Signalverstärkung, des gebundenen Antikörpers. Zur Anwendung kam in der vorliegenden Arbeit sowohl paraformaldehydfixiertes, als auch frisch eingefrorenes Gewebe. Fixiertes Gewebe hat den Vorteil, dass die ursprüngliche Gewebestruktur besser erhalten bleibt. Daraus folgt mikroskopisch eine gute zelluläre Auflösung. Bei frisch eingefrorenen Geweben hingegen ist diese Auflösung deutlich schlechter. Ihr Vorteil allerdings besteht darin, dass eine durch Fixative mögliche Maskierung bestimmter Epitope nicht zu befürchten ist. Zur Aufnahme der mikroskopischen Bilder wurden zwei verschiedene Mikroskoptypen verwendet, zum einen ein Lichtmikroskop für die Einfachmarkierungen, zum anderen ein Laser-Scanning-Mikroskop für die Mehrfach-fluoreszenzmarkierungen, welches den Vorteil hat, dass hier lediglich eine bestimmte Ebene betrachtet werden kann, ohne dass die darüber- oder darunterliegenden Strukturen stören, wodurch diese Abbildungen deutlich fokussierter erscheinen. Weiterhin ist vorteilhaft, dass die Signale verschiedenfarbiger Fluoreszenzmarkierungen deutlich voneinander abgrenzbar sind.

5.2 Die β -Amyloidplaques im Hirn der Tg2576-Maus

Die Analyse der regionalen Verteilung der β -Amyloidplaques im Hirn der transgenen Maus zeigt eine höhere Plaquebeladung im posterioren Teil und hier besonders im primär motorischen bzw. im piriformen Kortex. Beide Hirnregionen sind auch im anterioren Teil die mit der höchsten Plaquebeladung. Die Auswirkungen auf die Rezeptorexpression und -dichte oder auf sonstige biochemische Veränderungen in den entsprechenden Regionen sind schwierig abzuwägen. In der vorliegenden Arbeit wurden stärkere Veränderungen teilweise in den anterioren, teilweise in den posterioren Gebieten beobachtet.

In der Literatur gibt es zwar viele Untersuchungen zur Plaquebeladung insgesamt aber nur in wenigen Arbeiten wurde bisher auf die regionale Verteilung eingegangen. APELT et al. (2002) fanden im frontalen Kortex eine Plaquebeladung von ca. 20% bei 16 Monate alten Tg2576-Mäusen während im Hippokampus ca. 5% beschrieben worden sind, was mit den hier dargestellten Ergebnissen übereinstimmt. IRIZARRY et al. (2001) beschrieben eine Amyloidbeladung von 4 bis 8% im zingulären Kortex und im Hippokampus bei 16 Monate alten Tg2576 Mäusen und bestätigen damit gleichermaßen die hier vorliegenden Ergebnisse, obwohl sie mit einem anderen Antikörper arbeiteten.

Die von CALLAHAN et al. (2001) beschriebenen geschlechtsspezifischen Unterschiede, nämlich eine höhere Plaquedichte in weiblichen im Vergleich zu männlichen adulten Tg2576-Mäusen, konnte nicht bestätigt werden. Hier wurde eher das Gegenteil beobachtet. Allerdings ist jenes Ergebnis, bedingt durch die kleine Anzahl untersuchter Tiere ($n=4$) vorsichtig zu betrachten. Da die Tg2576-Mäuse jedoch zuverlässig β -Amyloidplaques ausbilden, eignen sie sich für dieses Merkmal der AD als Modelltiere.

Vielfache Anstrengungen wurden in den letzten Jahren unternommen, um ein wirksames Therapeutikum für eine verminderte Amyloidogenese bei der Alzheimerschen Krankheit zu entwickeln. Viele Arbeitsgruppen konzentrierten sich dabei auf die Beeinflussung der APP-Prozessierung, Verringerung der Neurotoxizität von A β und eine verstärkte Beseitigung von β -Amyloid im Hirn. Eine mögliche zukünftige Behandlung dieser Erkrankung könnte aber auch in der Verhinderung der Amyloidfibrillenformation bestehen. Aus diesem Grunde wurden unter anderem Peptidverbindungen entwickelt, die sich homolog zur zentralen hydrophoben A β -

Region, welche eine zentrale Rolle bei der Zusammenlagerung von fibrillärem β -Amyloid spielt, an endogene Amyloidsequenzen anlagern können und damit die Fibrillogenese verhindern. Diese Verbindungen enthalten Prolin, von welchem bekannt ist, dass es kaum in β -Faltblattstrukturen vorkommt und ihrer Bildung entgegen wirkt. Solche Peptide wurden zuerst von SOTO et al. (1996) und von TJERNBERG et al. (1996) entwickelt. Das von SOTO et al. (1998) entwickelte Pentapeptid zeigte *in vitro* eine verringerte Amyloidformation, beugte der Amyloidneurotoxizität in der Zellkultur vor und hemmte die A β -Ablagerung im Rattenhirn. Diese so genannten β -Faltblatt aufbrechenden Peptide könnten aber durch ihre spezifische Bindung an β -Amyloidstrukturen auch als Erfolg versprechendes zukünftiges Diagnostikum für Plaques im Menschen angesehen werden, wenn es gelänge, diese Verbindungen so zu markieren, dass sie mit bildgebenden Verfahren im Gehirn darstellbar wären und somit Aggregationen dieses Peptids die β -Amyloidplaques erkennbar machten.

Zur Überprüfung der Eignung für eine spätere *in vivo* Markierung wurden mit dem vorliegenden Peptid zunächst *in vitro* Bindungsstudien durchgeführt, wobei das Pentapeptid mit ^{131}I radioaktiv markiert wurde. Jedoch konnte nicht die erwartete spezifische Bindung an die β -Amyloidplaques in den Hirnschnitten der transgenen Mäuse erzielt werden, was möglicherweise auch an der Art der Markierung lag. Der Versuch wurde nicht weiter optimiert, da das Peptid inzwischen von anderen Arbeitsgruppen weiter entwickelt worden war. Problematisch bei der *in vivo* Anwendung solcher kurzen Aminosäureverbindungen ist ihr Abbau durch die im Organismus vorhandenen endogenen Proteasen und im Gehirn zusätzlich ihre schlechte Durchgängigkeit durch die Blut-Hirn-Schranke. PERMANNE et al. (2002) sowie ADESSI et al. (2003) entwickelten durch Modifizierungen ein synthetisches Peptid, welches besser durch die Blut-Hirn-Schranke penetriert und stabiler gegen proteolytischen Abbau ist.

5.3 Die Veränderungen im cholinergen System der Tg2576-Maus

Im Zusammenhang mit cholinergen Defiziten wird in post mortem Hirnen von Alzheimerpatienten reproduzierbar eine verringerte Enzymaktivität der Azetylcholinesterase festgestellt (z. B. KASA et al. 1997, DAVIS et al. 1999). Daraus wurde geschlussfolgert, dass die AChE-enthaltenden Neurone besonders vulnerabel sind. Als Ursache liegt hier möglicherweise eine besondere Beziehung zwischen

AChE und β -Amyloid zugrunde. Als Resultat dieser Komplexbildung könnte sich eine erhöhte Neurotoxizität sowie die Stimulation der Plaquebildung ergeben (GIACOBINI 2003). In den transgenen Mäusen (Tg2576) wurden solche Komplexe bereits beschrieben (APELT et al. 2002). Eine Verringerung der AChE-Enzymaktivität konnte in diesem Mausmodell jedoch nicht nachgewiesen werden (APELT et al. 2002, GAU et al. 2002), was auch mit den in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnissen konsistent ist. Die Ursache könnte z. B. darin liegen, dass die im Kortex der Maus befindlichen kortikalen Afferenzen cholinergischer Neurone aus dem basalen Vorderhirn weniger vulnerabel sind als die im menschlichen Hirn.

Da bei Alzheimerpatienten häufig ein Aktivitätsdefizit festgestellt wurde, sollte eine Methode entwickelt werden, um die AChE *in vivo* markieren zu können. Die Methode stützt sich auf zwei Publikationen, die ein Molekül beschrieben, welches die Blut-Hirn-Schranke von Ratten penetriert und dessen Metaboliten im Hirn nachweisbar sein sollten (IRIE et al. 1994; NAMBA et al. 1994). Diese Methode erwies sich allerdings in der Maus als nicht ausreichend spezifisch und sensitiv.

Die Quantifizierung der [^3H]Hemicholinium-3(HCh-3)-Bindung an den hoch affinen Cholintransporter dient dem Nachweis des Verlustes kortikaler cholinergischer Fasern, was auch bei der IgG-Saporin induzierten cholinergen Immunoläsion an Ratten deutlich wurde (ROSSNER et al. 1995). In der vorliegenden Studie wurden jedoch kaum Veränderungen in der [^3H]HCh-3-Bindung bei den älteren (17 Monate), dafür aber vor allem bei den fünf Monate alten Tg2576-Mäusen im Vergleich zum Wildtyp gefunden. Die ultrastrukturellen Studien, die kürzlich durch LÜTH et al. (2003) an diesen Mäusen durchgeführt wurden, weisen jedoch nur auf eine Degeneration der cholinergischen Fasern bei den älteren Mäusen mit deutlicher β -Amyloidplaqueablagerung hin, nicht aber bei den jüngeren, die noch keine solchen Aggregationen aufweisen. Hierbei könnte es sich um einen Effekt des löslichen β -Amyloids handeln, wie er in Experimenten an Zellkulturen nachgewiesen wurde. So kann beispielsweise lösliches β -Amyloid bereits in pico- bis nanomolaren Konzentrationen die Kalium-stimulierte ACh-Freisetzung in Hippokampuschnitten hemmen (KAR et al. 1996) sowie die Cholin Aufnahme in Synaptosomenpräparationen von Rattenkortex (KAR et al. 1998) und die Cholinazetyltransferase-, nicht jedoch die AChE-Aktivität in der cholinergen Zelllinie SN56 verringern (PEDERSEN et al. 1996). Möglicherweise erklären sich damit auch die Befunde, dass die AChE-Aktivität in diesen Mäusen unverändert ist, während die Veränderungen beim HACU auf eine beeinträchtigte

Aktivität und strukturelle Defizite im cholinergen System hinweisen. β -Amyloid vermag außerdem, die intrazelluläre Konzentration von ACh zu verringern (HOSHI et al. 1997).

Die in dieser Studie ermittelten Daten stimmen nicht mit der Untersuchung von GAU et al. (2002) überein, bei der keine Veränderungen zwischen transgenen Tieren und Wildtyp gefunden worden sind. Diese Differenzen sind möglicherweise mit der unterschiedlichen Verteilung von männlichen und weiblichen Tieren in beiden Untersuchungen zu erklären. Während GAU et al. (2002) hauptsächlich weibliche transgene und männliche Kontrolltiere nutzte, flossen in der hier beschriebenen Studie Daten beider Geschlechter in die Auswertung für die transgenen Tiere ein. An Ratten wurde nachgewiesen, dass altersabhängig die Abnahme cholinerges Fasern bei weiblichen Tieren langsamer voranschreitet als bei Böcken (LUKOYANOV et al. 1999).

Die Ergebnisse der Untersuchung humanen Autopsiematerials stehen zum Teil im Gegensatz zu denen dieser Arbeit. BISSETTE et al. (1996) berichten von einer signifikanten Erhöhung der HCh-3-Bindung im Kortex, welche auf einer erhöhten Anzahl aber unveränderter Affinität der Transporterbindungsstellen beruht und führen dieses Ergebnis auf einen Defekt der Cholinverwertung in den Zellen zurück. Andere Arbeitsgruppen jedoch bestätigen eine Verringerung der HCh-3-Bindung in kortikalen Gebieten (RODRIGUEZ-PUERTAS et al. 1994) bzw. berichten über keine Veränderung (KRISTOFIKOVA et al. 1995) im Vergleich zu nicht an AD Erkrankten. Diese Unterschiede könnten im Zusammenhang mit postmortalen Veränderungen im Hirn der Patienten stehen.

Hinsichtlich der Veränderungen beim vesikulären Azetylcholintransporter waren bei den fünf Monate alten Mäusen keine Unterschiede zwischen den transgenen Tieren und dem Wildtyp erkennbar. Jedoch in den älteren 17 Monate alten Tieren mit deutlicher Plaqueablagerung trat eine signifikante Erhöhung der [^3H]Vesamicol-Bindung an den vesikulären Azetylcholintransporter auf, die offensichtlich durch eine Zunahme der Transporter mit steigendem Alter bei den transgenen Tieren erklärbar ist. Nach der von LÜTH et al. (2003) durchgeführten Studie, die mikroskopische Hinweise auf β -Amyloid-assoziierte Degeneration von cholinergen Terminalen gibt, hätte eine Verringerung der [^3H]Vesamicol-Bindung erwartet werden müssen. Möglicherweise ist die hier gemachte Beobachtung in einer erhöhten Vesikeldichte begründet. Diese Ergebnisse stehen in Diskrepanz zu den in der Literatur pub-

lizenzierten Daten. GAU et al. (2002) finden keine Veränderungen in der [^3H]Vesamicol-Bindung an die VACHT-Rezeptoren in Tg2576-Mäusen im Vergleich zu nicht transgenen Kontrolltieren in verschiedenen Altersstufen von 14 bis 23 Monaten. Sie finden auch keine signifikanten Unterschiede, weder in der [^3H]HCh-3 noch in der [^3H]Vesamicol-Rezeptorbindung im Altersgang von 14 bis 23 Monate alten Tieren.

Bei der Untersuchung von Autopsiematerial von Alzheimerpatienten ist das Ergebnis gleichfalls nicht einheitlich. Während KISH et al. (1990) sowie EFANGE et al. (1997) eine Verringerung der VACHT-Dichte beobachteten, die im Zusammenhang mit dem Verlust cholinergischer Projektionsneuronen stehen soll, konnten RUBERG et al. (1990) ebenfalls eine Erhöhung finden.

Die Untersuchungen zur Genexpression der muskarinischen Rezeptoren in Tg2576-Mäusen gelangen für die m_3 - und m_4 -Rezeptorsubtypen. Die *in situ* Hybridisierung wurde mit ^{35}S -markierten synthetischen Oligonukleotiden durchgeführt, die komplementär zu Teilen der mRNA sind, welche für die muskarinischen Azetylcholinrezeptoren M_1 bis M_4 kodieren. Da es sich bei den verwendeten Oligonukleotiden um Rattensequenzen handelte, wurde zuvor eine Überprüfung der Übereinstimmung mit den Sequenzen der Maus durchgeführt und keine bzw. nur sehr geringe Abweichungen gefunden. Die autoradiografische Auswertung ergab jedoch unspezifische Muster für die m_1 - und m_2 -mRNA Subtypen, weshalb diese nicht in die Auswertung mit einbezogen werden konnten. Ursprünglich wurde erwartet, dass die gefundenen geringfügigen Sequenzunterschiede keine Beeinträchtigung der Oligonukleotidbindung an die mRNA bewirken würden. Diese Annahme erwies sich teilweise als falsch. Die Quantifizierung der Autoradiografien ergab eine geringfügige, jedoch signifikante Verringerung der Genexpression des m_3 -Subtyps im primär motorischen und im primär somatosensorischen Kortex anterior bei den 17 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Wurfgeschwistern, was auf einen Effekt der β -Amyloidplaques hindeuten könnte. Die Veränderungen im m_4 -mRNA Subtyp fielen weniger deutlich aus. In der Literatur gibt es kaum Untersuchungen hinsichtlich der muskarinischen Azetylcholinrezeptor-mRNA bei Alzheimerpatienten. Nach cholinergischer Immunoläsion an Ratten konnten ROSSNER et al. (1995) keine statistisch signifikanten Veränderungen der m_3 - und m_4 -mAChR-mRNA feststellen. Jedoch sind diese Daten nicht direkt mit den in den transgenen Mäusen ermittelten vergleichbar, da es sich um ein akutes cholinerges Läsionsmodell ohne Plaqueentwicklung handelt.

Die immunhistochemischen Markierungen der nikotinischen α_7 AChR ergaben keine offensichtliche Beeinflussung der diesen Rezeptor exprimierenden Neuronen durch die genetische Veränderung der Mäuse. Frühere autoradiografische Untersuchungen im gleichen Mausmodell zeigten hingegen eine signifikante Erhöhung der α_7 nAChR-Bindungsspiegel bei 17 bis 19 Monate alten transgenen Mäusen im Vergleich zum Wildtyp (BEDNAR et al. 2002). Dieser Befund spricht für die offensichtlich höhere Sensitivität autoradiografischer Untersuchungen mit computergestützten Auswertesystemen im Gegensatz zu immunhistochemischen Markierungen, bei welchen die Unterschiede durch visuelle Auswertung am Mikroskop festgestellt werden.

Studien über den Einfluss von β -Amyloid auf nAChR in Autopsiegewebe von Patienten mit der schwedischen Mutation der Alzheimerschen Erkrankung haben ergeben, dass es keine direkte Beziehung zwischen nAChR-Defiziten und der Pathologie gibt (NORDBERG 2001). Eine Studie an Tg2576-Mäusen fand eine Hochregulierung der α_7 nAChR-Proteine im Hippokampus (DINELEY et al. 2001). In Autopsiematerial von Alzheimerpatienten wurden allerdings gegensätzliche Befunde erzielt. So berichten GUAN et al. (2000) von verringerten Proteinkonzentrationen der α_4 - und α_7 -Subtypen sowie MARTIN-RUIZ et al. (1999) von verringertem Vorkommen der α_4 -Untereinheit, nicht jedoch des α_7 nACh-Rezeptorsubtyps.

Einer kürzlich veröffentlichten Studie (TEAKTONG et al. 2003), nach der auch reaktive Astrozyten vermehrt den α_7 nAChR-Subtyp exprimieren, wird das dieser Arbeit zugrunde liegende Mausmodell Tg2576 nicht gerecht. Solche Kollokalisierungen wurden in der vorliegenden Arbeit nicht gefunden.

Der α_4 nAChR-Subtyp ist im Hirn weit verbreitet. Auch hier ist kein negativer Einfluss auf die Neuronen, beispielsweise in Form einer Degeneration in der Plaquesumgebung, erkennbar, wenn die den α_4 nAChR-tragenden Terminalen mit immunhistochemischer Markierung dargestellt werden. Man könnte höchstens eine Verdrängung der α_4 -exprimierenden Zellen vermuten. Auch in diesem Falle sind die Angaben aus der Literatur sehr widersprüchlich. Während BEDNAR et al. (2002) eine Erhöhung in der [3 H]Cytisin-Bindung bei den 17 bis 19 Monate alten Tg2576-Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren finden, berichten APELT et al. (2002) von signifikant verringerten [3 H]Cytisin-Bindungsspiegeln zweier Hirnregionen in eben diesen Mäusen. Obwohl Cytisin sowohl an das α_7 -Pentamer als auch an die α_4 - und β_2 -Untereinheiten enthaltenden nAChR bindet, hat es eine deutlich höhere Affinität zu letzterem Rezeptor. Hier beträgt der K_i -Wert 0,46 nM, während der für das α_7 Pentamer bei

1400 nM liegt (DE FIEBRE et al. 1995). Die im Zusammenhang mit dieser Arbeit durchgeführten autoradiografischen Untersuchungen an der α_4 -Rezeptoruntereinheit ergaben keine signifikanten Veränderungen der [^3H]Cytisin-Bindungsspiegel im Vergleich mit Wildtypmäusen, weder in der jüngeren, noch in der älteren Tiergruppe. Allerdings wurde beobachtet, dass insgesamt bei den älteren Tieren erhöhte Bindungsspiegel vorlagen, was eigentlich im Widerspruch zu der Aussage steht, dass beim Menschen die α_4 und α_7 nAChR mRNA- Konzentrationen mit dem Alter abnehmen. Möglicherweise gibt es auch hier zusätzliche Gegenregulationsmechanismen, wie z. B. die Neuroprotektion, die zum Teil auch den α_4 -Untereinheiten zugeschrieben wird. BEDNAR et al. (2002) finden hingegen bei den Kontrolltieren mit zunehmendem Alter eine Abnahme der Rezeptorbindung, während dies bei den transgenen Mäusen nicht beobachtet wurde. Auch in Membranpräparationen bei doppelt transgenen Mäusen, die sowohl die schwedische APP-Mutation tragen als auch Präsenilin 1 überexprimieren und daher deutlich früher Amyloidplaques ausbilden, konnten keine signifikanten Veränderungen weder der [^3H]Cytisin-Bindung, noch der [^{125}I] α -Bungarotoxin-Bindung, welches spezifisch an α_7 nAChR bindet, festgestellt werden (MARUTLE et al. 2002).

Beim Menschen jedoch gehören die cholinergen Defizite, einschließlich nikotinischer Rezeptorveränderungen, zu den unbestrittenen pathologischen Charakteristika der Alzheimerschen Krankheit. Da diese Veränderungen bei den transgenen Mäusen nicht bzw. nur sehr schwach und uneinheitlich ausgeprägt sind, kann vermutet werden, dass im menschlichen Hirn neben den bekannten weitere Prozesse ablaufen, die zur Entwicklung der Erkrankung führen, welche allerdings bei den transgenen Tieren so nicht vorkommen (MARUTLE et al. 2002).

Abschließend soll noch darauf verwiesen werden, dass die nikotinischen Azetylcholinrezeptoren zu einem nicht geringen Ausmaß auch auf nicht cholinergen Nervterminalen vorhanden sind, was Experimente mit Immunotoxin- und Ibotensäureläsionen an Ratten bewiesen. Dadurch entstand die Annahme, dass nikotinische ACh-Rezeptoren als Neuromodulator auch in nicht cholinergen Nervterminalen Bedeutung haben könnten (NORDBERG 2001).

5.4 Die Veränderungen im adrenergen System der Tg2576-Maus

Die Gruppe der α -Adrenozeptoren wird in zwei Untergruppen gegliedert: die postsynaptisch lokalisierten α_1 - und die meist inhibitorisch wirkenden, präsynaptischen α_2 -Rezeptoren. Mittels molekularbiologischer und pharmakologischer Methoden konnten beide Gruppen weiter unterteilt werden, sodass heute jede Gruppe in mindestens drei Subtypen gegliedert ist.

Zur Charakterisierung der α_1 -Adrenozeptoren wurde der Ligand [^3H]Prazosin, ein selektiver Antagonist, gewählt. Die regionale Verteilung der Rezeptordichte stimmt mit der von anderen Autoren bei Mäusen dargestellten im Wesentlichen überein (z. B. GOFFINET u. CAVINESS 1986). In einer Bindungsstudie, die von SHIMOHAMA et al. (1986) an humanem Autopsiematerial durchgeführt wurde, konnte eine signifikante Verringerung der Rezeptoranzahl im Hippokampus festgestellt werden, während diese im frontalen Kortex unverändert bleibt. Die höchsten [^3H]Prazosin-Bindungen im humanen Gehirn werden bei SHIMOHAMA et al. (1986) im frontalen Kortex und im Hippokampus beschrieben. In der im Zusammenhang mit dieser Arbeit durchgeführten Autoradiografie ist der Hippokampus allerdings eine Region, die, verglichen mit anderen Hirnregionen, eine deutlich niedrigere Rezeptorbindung aufweist. In einer von ZILLES et al. (1991) durchgeführten Arbeit wurden Ratten- und humane Hippokampi hinsichtlich ihrer α_1 -Adrenozeptor-Bindung mittels [^3H]Prazosin-Autoradiografie verglichen, wobei beachtliche Unterschiede zwischen den Spezies festgestellt wurden. Für Mäuse liegt ein solcher Vergleich nicht vor, jedoch kann man davon ausgehen, dass der Hippokampus der Maus eher dem der Ratte ähnlich ist, wodurch der Modellcharakter von Mäusen für dieses Merkmal der humanen Erkrankung in Frage steht. Die Ergebnisse der altersabhängigen Untersuchungen werden durch NOWAK und SILBERRING (1988) bestätigt, die, allerdings in Ratten, eine signifikante Abnahme der Anzahl der kortikalen α_1 -Adrenozeptoren mit zunehmendem Alter beobachteten.

Die α_2 -Adrenozeptor-Bindungsspiegel, welche mittels [^3H]Rauwolscin-Autoradiografie ermittelt wurden, wiesen im Vergleich zu nicht transgenen Kontrolltieren bei den 17 Monate alten transgenen Tieren eine signifikante Erhöhung im zingulären und piriformen Kortex auf. Dies ist nicht konsistent mit den experimentellen Befunden an humanem Autopsiematerial. So berichten MEANA et al. (1992) unter anderem von verringerten Bindungskapazitäten der α_2 -Adrenozeptoren im frontalen Kortex, wobei hier nicht der Antagonist Rauwolscin, sondern ein Agonist (Bromoxidine, UK-14304)

als Radioligand fungierte, was die Unterschiede erklären könnte. Bei einer späteren Bindungsstudie mit gleichem Agonisten wurde herausgefunden, dass signifikant erhöhte Bindungsspiegel nur bei Patienten mit aggressivem Verhalten und nur im Kleinhirn auftraten (RUSSO-NEUSTADT u. COTMAN 1997). Weiterhin ist bei allen Vergleichen von pathologischen Rezeptorveränderungen zwischen transgenen Mäusen, die als Modellsysteme einer Erkrankung betrachtet werden, und Alzheimerpatienten nicht nur der Speziesunterschied, sondern auch die Beeinflussung durch Medikamente beim Menschen zu beachten. Fast alle Patienten erhalten im Verlaufe ihrer Krankheit Neuropharmaka, wobei diese möglicherweise bestimmte Rezeptorsysteme modulieren. So ist beispielsweise bekannt, dass neuroleptische Medikamente die Dichte adrenerger Rezeptoren im Hirn von Säugetieren beeinflussen können.

Die Untersuchung der β -Adrenozeptoren wurde mittels des Radioliganden [^3H]Dihydroalprenolol (DHA) durchgeführt. Es handelt sich hierbei um einen nicht selektiven Rezeptorantagonisten, der sowohl an β_1 - als auch an β_2 -Adrenozeptoren bindet, die von den insgesamt vier bekannten β -Rezeptortypen von Bedeutung im Gehirn sind. Die im Vergleich zu Kontrollmäusen in allen vermessenen Hirnregionen verringerten Ligandbindungsspiegel bei den fünf Monate alten transgenen Tieren waren nur in einem Fall signifikant. Bei den 17 Monate alten Tieren konnte in einer Hirnregion eine signifikante Verringerung der [^3H]DHA-Spiegel ermittelt werden, wobei ansonsten die Veränderungen relativ inhomogen erschienen. Die Ursache einer verringerten Ligandbindung an seinen Rezeptor kann zum einen im Verlust von auf degenerierenden Terminalen befindlichen Rezeptoren liegen, andererseits in einer verringerten Rezeptoraktivität infolge erhöhter Aktivität des entsprechenden Transmittersystems.

Analysen, die an Patienten mit Alzheimerscher Erkrankung post mortem durchgeführt wurden, finden insgesamt keine Veränderungen in der autoradiografischen β -Rezeptor-Radioligandbindung, wobei die β_1 -Rezeptor-Bindungsspiegel erhöht und die der β_2 -Adrenozeptoren verringert waren (D'AMATO et al. 1987; KALARIA et al. 1989). Möglicherweise kommt das in dieser Studie vorgelegte Ergebnis durch eine unterschiedliche Verteilung der Rezeptoren im Mäusehirn im Vergleich zu dem des Menschen zustande. Weitere Untersuchungen mit selektiven Liganden für β_1 - und β_2 -Adrenozeptoren sind zur Abklärung des Ergebnisses notwendig. Auch der signifikante Anstieg der [^3H]DHA-Bindungsstellen bei transgenen Mäusen mit zuneh-

mendem Alter bedarf weiterer Untersuchungen, um zu klären, ob es sich hierbei um kompensatorische Mechanismen handelt und ob der beobachtete Effekt auf durch lösliches β -Amyloid induzierte Veränderungen zurückzuführen ist.

5.5 Untersuchungen zum Energiestoffwechsel der Tg2576-Maus

Die autoradiografischen Untersuchungen mittels [^3H]Cytochalasin-B-Autoradiografie, durch welche die Summe aller Glukosetransporter quantifiziert wurde, ergaben in keiner Altersgruppe signifikante Unterschiede zwischen den transgenen Tieren und ihren nicht transgenen Wurfgeschwistern. Damit stimmen die Ergebnisse mit einer Studie überein, die kürzlich über den Zusammenhang zwischen Glukosestoffwechsel und Bildung sowie Ablagerung von β -Amyloid bei diesen transgenen Mäusen durchgeführt wurde (BIGL et al. 2003). Darin wurden die Schlüsselenzyme der Glukoneogenese und Glykolyse in ihrer Expression und Aktivität im Hirn der Tg2576 untersucht. Es wurde gezeigt, dass eine Beeinträchtigung des zerebralen Glukosemetabolismus bei diesen Tieren erst nach hoher und lang andauernder β -Amyloidbelastung auftritt. Bei einer Untersuchung mittels der [^{14}C]2-Desoxyglukose-Methode nach SOKOLOFF hingegen, die von NIWA et al. (2002) an zwei bis drei Monate alten Tg2576-Mäusen durchgeführt wurde, war der zerebrale Glukoseverbrauch bei den transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Wurfgeschwistern deutlich niedriger, wobei es auch zu vermindertem zerebralen Blutfluss kam. Diese Beobachtungen wurden mit den toxischen Effekten begründet, die das β -Amyloid bereits in nicht aggregierter, löslicher Form auf die Zellen ausübt. Ein geringerer Glukoseverbrauch wurde auch bei Mäusen mit der schwedischen Mutation des humanen APP-Gens, allerdings auf der Grundlage einer anderen Mauslinie als der bei den in dieser Studie untersuchten, beobachtet (HSIAO et al. 1995). Auch bei einer zweiten transgenen Mauslinie mit anderer Mutation (V717F, Londoner Mutation) mit APP-Überexprimierung und neuritischer Dystrophie wurde Glukosehypometabolismus festgestellt (DODART et al. 1999). Da bei ersterem Mausmodell kein neuronaler Zelltod auftritt, kann dieser verringerte Glukoseverbrauch entweder durch beeinträchtigten Transport bzw. Metabolismus der Glukose entstehen. Es wurde jedoch im Zusammenhang mit dieser Arbeit nachgewiesen, dass die Gesamtheit der Glukosetransporter bei fünf bzw. 17 Monate alten transgenen Mäusen keine Veränderungen im Vergleich zu nicht transgenen

Tieren aufweist, und BIGL et al. (2003) fanden, abgesehen von sehr alten Mäusen, keine Veränderungen in der Aktivität glykolytischer Schlüsselenzyme.

PET-Studien an Menschen, die unter der Alzheimerschen Erkrankung litten, ergaben bereits im Frühstadium einen auffällig reduzierten Glukosemetabolismus, sowie verringerte Dichten kortikaler Glukosetransportersubtypen, darunter GLUT1 und GLUT3 (VANNUCCI et al. 1997) und veränderte Aktivitäten glykolytischer Enzyme (BIGL et al. 1999). Vor allem dem herabgesetzten Glukosemetabolismus wird eine Hauptrolle in der Pathogenese der sporadischen Form der Alzheimerschen Erkrankung zugeschrieben. Wie bereits in der Literaturübersicht (Kap. 2.1.2.7) erwähnt, wird durch HOYER (2000) die Theorie vertreten, dass es sich bei der sporadischen Form der AD ursächlich um eine Desensibilisierung der kortikalen Insulinrezeptoren sowie eine verringerte Insulinkonzentration im Hirn handelt, wodurch ein kaskadenähnlicher Prozess in Gang gesetzt wird, der unter anderem zu einer Verringerung der zellulären Glukoseverfügbarkeit führt. Da Insulin im Gegensatz mit Kortisol die zelluläre Glukoseaufnahme stimuliert, könnte ein Mangel an Insulin dazu führen, dass der Glukosemetabolismus wie im hier beschriebenen Mausmodell beeinträchtigt ist, während sowohl die Anzahl der Glukosetransporter wie auch die glykolytischen Enzyme keine signifikanten Veränderungen aufweisen. Eine Untersuchung der Insulin-Signalkaskade wäre zur Überprüfung dieser Hypothese im vorliegenden Mausmodell notwendig.

Die Möglichkeit der immunhistochemischen Darstellung der einzelnen Glukosetransporter wurde ausgenutzt, um Aussagen über das Verhalten der Hirnkapillaren in unmittelbarer Nähe der β -Amyloidplaques treffen zu können.

Die Familie der integralen Membranproteine der Glukosetransporter durch sieben Gene (GLUT1 bis 7) repräsentiert, die für sechs Proteine kodieren. Dabei ist GLUT 6 ein Pseudogen ohne entsprechendes Protein. GLUT1 kodiert hingegen für zwei Unterformen, die sich im Ausmaß ihrer Glykosylierung (55 bzw. 45 kDa), in ihrem Expressionsort sowie in ihrer Funktion unterscheiden (VANNUCCI et al. 1997). Der 55 kDa große GLUT1 ist für die vorliegende Analyse von besonderem Interesse, weil er sowohl in Erythrozyten als auch in Endothelzellen exprimiert wird und damit Bestandteil der Kapillaren ist, welche sich durch Antigenmarkierung des GLUT1 eindrucksvoll darstellen lassen. Durch die kombinierte Darstellung von Amyloidplaques und Kapillaren am selben Hirnschnitt sollten Aussagen zur Hirndurchblutung in Plaquenähe bei den Tg2576-Mäusen getroffen werden. Solche Kenntnisse wären

bei der Beurteilung von Tracern zur *in vivo* Detektion von Plaqueablagerungen nutzbar. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es tatsächlich, wenn auch nur geringfügige, Unterschiede in der Kapillarverteilung in der Nähe der β -Amyloidplaques bei den untersuchten transgenen Mäusen gibt. So war die in geringerem Abstand (vierfacher Radius) vom betreffenden Plaque gemessene Kapillardichte kleiner als die, welche in weiterer Entfernung (siebenfacher Radius) vom Plaque ermittelt wurde. Möglicherweise werden durch die Entwicklung der β -Amyloidplaques die direkt um die Plaqueablagerungen herum befindlichen Kapillaren verdrängt, während das sich daran anschließende gesunde Hirngewebe verdichtet und damit die Anzahl der Kapillaren erhöht wird. Andererseits könnte auch in den unmittelbar an die Plaques angrenzenden Hirngebieten eine Minderdurchblutung stattfinden, die durch vermehrte Perfusion in weiter entfernt liegenden Gebieten kompensiert werden soll. Solche Beobachtungen der Hypoperfusion wurden bereits bei Alzheimerpatienten und auch bei verschiedenen Tiermodellen (unter anderem auch in Tg2576; s. NIWA et al. 2002) gemacht, bei denen der zerebrale kortikale Blutfluss verringert war. Allerdings war diese Verringerung bezogen auf das gesamte Gehirn und nicht auf Zusammenhänge hinsichtlich der Entfernung der Kapillaren vom β -Amyloidplaque. Möglicherweise entspricht die als vermehrte Perfusion angesprochene Blutversorgung bzw. Kapillarverteilung in den Tg2576-Mäusen auch normalen Werten, was nicht überprüft werden konnte, da die Plaquedichte bei den untersuchten 24 Monate alten Mäusen so hoch ist, dass eine Beeinflussung in der weiteren Umgebung durch angrenzende Plaques nicht ausgeschlossen werden kann und somit diese weitere Umgebung nicht untersucht worden ist. In einer von KAWAI et al. (1990) angefertigten Analyse wurde herausgefunden, dass die Kapillarverteilung in Autopsiematerial von Alzheimerpatienten sich genau entgegengesetzt zu der in den transgenen Mäusen ermittelten verhält, nämlich, dass in den direkt an die Plaques angrenzenden Gebieten die Kapillardichte höher ist als in den weiter entfernt liegenden. In diesen menschlichen Gehirnen befanden sich allerdings auch 60 bis 77% der Plaques in direktem Kontakt mit bzw. waren sogar penetriert von Kapillaren, was durchaus nicht dem Befund der dieser Arbeit zugrunde liegenden Untersuchung entsprach. Trotz umfangreichen Screenings konnten keine Gefäße entdeckt werden, die in direkter Beziehung mit einem β -Amyloidplaque standen. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die pathologischen Vorgänge in der transgenen Maus Tg2576 nicht der von manchen Autoren hinsichtlich der

Alzheimerschen Erkrankung vertretenen These entsprechen, welche besagt, dass die β -Amyloidplaques in Folge einer beeinträchtigten Vasoregulation gebildet werden.

Seitdem das Vorhandensein von Sulfonylharnstoffrezeptoren auch im Hirn bekannt ist, wurde versucht, ihre Funktion besonders im Zusammenhang mit der Erforschung der bei Alzheimerpatienten bekannten Defizite im Glukosestoffwechsel zu ergründen. Bekannt ist diese Substanz seit den fünfziger Jahren als potentes Medikament bei insulinunabhängigem Diabetes mellitus. In den β -Zellen des Pankreas können Sulfonylharnstoffe die Wirkung der Glukose und somit Teile des Glukose-Insulin-Regelkreises nachahmen: durch sie werden ATP-sensitive Kaliumkanäle gehemmt, was eine Depolarisation der Zellmembran bewirkt. Dadurch werden Kalziumkanäle geöffnet, welche ihrerseits die Zunahme des intrazellulären Kalziums einleiten, in dessen Folge Insulingranula aus den Speichern freigesetzt werden (FRANCESCONI 2003).

Im Hirn wird eine mögliche Beteiligung an der Regulierung des metabolischen Status der Neuronen (ATP/ADP-Verhältnis) und ihrer Erregbarkeit vermutet (LISS u. ROEPER 2001). Dazu wurde sich unter anderem des Sulfonylharnstoffderivates Glibenclamid bedient, welches einen potenten Blocker der ATP-sensitiven Kaliumkanäle darstellt und der auch in der hier vorliegenden Bindungsstudie als tritiummarkierter Radioligand genutzt wurde. Die ermittelte Verteilung der Bindungsstellen stimmt mit früheren Ergebnissen von an Mäusen durchgeführten Autoradiografien überein (ZINI et al. 1993). Unabhängig vom Alter der Tiere zeigten die transgenen Mäuse im Vergleich mit ihren nicht transgenen Wurfgeschwistern kaum Veränderungen in den Bindungsspiegeln für [^3H]Glibenclamid. Damit stimmen die Beobachtungen dieser Studie mit den an Alzheimerpatienten ermittelten Werten überein, wonach trotz schwerer cholinergischer Defizite keine signifikanten Veränderungen in der Sulfonylharnstoffrezeptordichte der untersuchten Hippokampi vorlagen (IKEDA et al. 1993).

5.6 Ausblick - die transgene Maus Tg2576 als Alzheimermodell

Transgene und auch andere Tiermodelle haben einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung geliefert. Unklarheit herrscht allerdings noch darüber, bis zu welchem Ausmaß sie wirklich ein Modell der Erkrankung darstellen und ob sie den Krankheitsverlauf ausreichend gut charakterisieren können.

Die gleiche Frage trifft auch auf das Tiermodell zu, welches Grundlage der vorliegenden Arbeit war- die transgene Maus Tg2576. In dieser Mauslinie wurde durch Insertion des humanen APP-Gens mit schwedischer Doppelmutation in das murine Genom gezielt ein pathologisches Merkmal der AD, nämlich die β -Amyloid-plaquebildung, erzeugt, mit dem Ziel, auch weitere, von Alzheimerpatienten bekannte Charakteristika vorzufinden. Dadurch ist das Tiermodell auf die Pathogenese, die für die erblichen Form der Krankheit angenommen wird, beschränkt. Die wichtigsten Nachteile des Mausmodells bestehen vor allem darin, dass kein hyperphosphoryliertes Tauprotein gebildet wird und dass der Neuronenuntergang, wenn überhaupt, nur sehr beschränkt im Hirn dieser Tiere vorkommt, während er beim Menschen ein herausragendes Merkmal darstellt. Durch artifizielle Läsionen kann zwar der neuronale Zelltod hervorgerufen werden, jedoch mit der Einschränkung, dass es sich dabei um akute Schädigungen mit anschließender Regeneration handelt. Die cholinergen Defizite stellen ein weiteres, bei Patienten sehr ausgeprägtes pathologisches Merkmal für die Erkrankung dar. Obwohl die vorhandenen Messdaten hier sehr schwanken, ist unbestritten, dass das cholinerge System stark beeinträchtigt ist. Dies scheint nach den hier vorliegenden und aus der Literatur bekannten Untersuchungen zumindest teilweise der Fall zu sein, wobei die nikotinischen Rezeptoren deutlich weniger beeinflusst erscheinen. Im Zusammenhang mit dem cholinergen System stehen auch die beobachteten kognitiven Defizite. Obwohl Verhaltens- und Gedächtnisdefizite bei den Tg2576-Mäusen nachgewiesen worden sind, herrscht Unklarheit über die Übertragbarkeit solcher Beobachtungen bei den Tieren auf die klinischen Symptome, die bei Alzheimerpatienten auftreten. Auch andere Transmittersysteme, wie z. B. das adrenerge, scheinen bei diesen Mäusen in Abhängigkeit von cholinergen Transmissionsdefiziten bzw. durch überexprimiertes APP und daraus folgender intensiver β -Amyloidproduktion lediglich geringe Schädigungen zu erleiden. In

diesem Kontext wird auch die Frage gestellt, ob die beobachtete β -Amyloidakkumulation überhaupt das zentrale Ereignis bei Morbus Alzheimer darstellt, die allerdings allein mit dem Mausmodell nicht zufriedenstellend beantwortet werden kann. Möglicherweise reagiert das Mäusehirn weniger empfindlich auf das β -Amyloid oder die Ursache für die AD ist nicht oder nur zu geringen Teilen in der vermehrten Entstehung und Ablagerung von β -Amyloid begründet. Weiterhin ungeklärt bleibt auch, was tatsächlich die auch hier beschriebenen Veränderungen im Transmittersystem der transgenen Maus bewirkt. Ist es die APP-Überexpression, die eingefügte schwedische Doppelmutation, ist es die Tatsache, dass es sich um humanes APP handelt oder sind die β -Amyloidplaques bzw. das lösliche β -Amyloid dafür verantwortlich? Zu dieser Frage können nur Vermutungen geäußert werden.

Das Mausmodell Tg2576 simuliert hinsichtlich der Pathogenese der Alzheimerschen Erkrankung nicht alle Aspekte der pathologischen Veränderungen im Hirn. Konsistent sind bei dieser transgenen Maus die β -Amyloidproduktion und -ablagerung im Hirn und die auch beim Menschen vorkommende entzündliche Reaktion um die Plaques. Damit kann sie als geeignetes Modell für Plaqueablagerungen, z. B. für die diagnostische Forschung, angesehen werden.

Abschließend sei noch darauf verwiesen, dass ein Vergleich zwischen den Ergebnissen, die post mortem bei Alzheimerpatienten gefunden werden, mit den bei Modelltieren beobachteten eigentlich nur mit größter Vorsicht durchgeführt werden kann, da wahrscheinlich allen Patienten im Verlauf ihrer Krankheit Medikamente verabreicht wurden, die mit hoher Wahrscheinlichkeit die Befunde, vor allem bei den Transmittersystemen, verfälschen. Eine standardisierte Untersuchung lässt sich dagegen am Tiermodell durchaus durchführen. Das transgene Mausmodell bietet die Möglichkeit, erste Hinweise auf mögliche Pathomechanismen zu erhalten, die dann weiter untersucht werden können. So könnten möglicherweise die beschriebenen Veränderungen im cholinergen System (vesikulärer ACh-Transporter und hoch affiner Cholintransporter) zur Verwirklichung einer *in vivo* Diagnostik beitragen.

6 Zusammenfassung

Margrit Klingner

Untersuchungen zu biochemischen und morphologischen Veränderungen im Hirn der transgenen Maus Tg2576 mit β -Amyloidplaque-Pathologie

Veterinär-Anatomisches Institut der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung, Abteilung Neurochemie, Medizinische Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im Januar 2004

Schlüsselwörter: β -Amyloid, transgene Maus Tg2576, cholinerges System

88 S., 38 Abb., 7 Tab., 225 Lit., 1 Anlage

Die Alzheimersche Erkrankung (AD) ist die häufigste Demenzerkrankung bei älteren Menschen in den westlichen Industriestaaten mit ständig wachsender Zahl der Erkrankten. Trotz angestrebter wissenschaftlicher und medizinischer Forschung ist u. a. noch keine Möglichkeit der klinischen Frühdiagnose dieser Erkrankung etabliert. In der vorliegenden Arbeit wurden am transgenen Mausmodell Tg2576 mit β -Amyloidplaque-Pathologie cholinerge und adrenerge Parameter sowie Einflussgrößen des Energiestoffwechsels untersucht, um transgen-induzierte neurochemische bzw. neuromorphologische Veränderungen im Hirngewebe zu erkennen. Außerdem sollte die Möglichkeit einer *ex vivo* Markierung solcher Moleküle getestet werden, von denen eine besondere Bindungsaffinität an β -Amyloidablagerungen bereits bekannt ist. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, diese Mauslinie weiterhin hinsichtlich ihres Modellcharakters für die Alzheimersche Erkrankung zu beschreiben und potenzielle Plaque-assoziierte Markermoleküle aufzufinden, die einen *in vivo* Nachweis der β -Amyloidablagerungen erlauben. Die so gewonnenen Erkenntnisse könnten zur Entwicklung neuer Strategien zur Frühdiagnostik der Alzheimerschen Erkrankung beitragen.

Genutzt wurden dazu v. a. die biochemischen Methoden der Rezeptorautoradiografie und der Immunhistochemie sowie der *in situ* Hybridisierung als molekularbiologische Methode. Weiterhin wurde eine radiochemische Methode zur *ex vivo* Darstellung der Azetylcholinesterase getestet.

Bei der Untersuchung des cholinergen Systems konnte eine signifikante Verringerung in der [³H]Hemicholinium-3-Bindung (als Marker des hoch affinen Cholintransporters) bei den fünf Monate alten transgenen Mäusen im Vergleich zu deren nicht transgenen Wurfgeschwistern festgestellt werden. Es wird hier von einem modulatorischen Effekt des löslichen β -Amyloids ausgegangen, da die jüngeren Tiere noch keine Plaqueablagerungen aufweisen, die Ursache solcher Veränderungen sein könnten. Beim vesikulären Azetylcholintransporter (VACHT) konnte eine signifikante Erhöhung in der [³H]Vesamicol-Bindung bei 17 Monate alten transgenen Mäusen im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren beobachtet werden, obwohl der gegenteilige Fall erwartet wurde. Das Ergebnis wird als Ausdruck einer erhöhten Vesikeldichte interpretiert.

Die immunhistochemische Untersuchung der α_4 - und α_7 -Untereinheiten der nikotinischen Azetylcholinrezeptoren ergab, dass die β -Amyloidplaqueablagerung keinen Einfluss auf morphologische Veränderungen der Neuronen hatte, die diese Rezeptoren tragen. Es gab keine Hinweise, dass solche Neuronen degenerieren.

Hinsichtlich der untersuchten Parameter des Glukosestoffwechsels konnten keine Veränderungen zwischen transgenen Tieren und nicht transgenen Wurfgeschwistern festgestellt werden. Bei der Verteilung der Hirnkapillaren konnte eine verringerte Dichte in unmittelbarer Umgebung der β -Amyloidplaques, verglichen mit weiter entfernt liegenden Gebieten, ermittelt werden. Dieser Befund bedarf weiterer Untersuchungen, da er Relevanz für die *in vivo* Diagnostik und Therapie besitzen könnte.

Im Vergleich mit den zwar oft nicht einheitlichen Befunden bei Alzheimerpatienten wird deutlich, dass das Mausmodell Tg2576 als Modell der Alzheimerschen Erkrankung nicht alle Aspekte der Pathogenese simuliert. Übereinstimmungen ergeben sich bei dieser transgenen Maus hinsichtlich der β -Amyloidproduktion und -ablagerung im Hirn und den auch beim Menschen vorkommenden entzündlichen Reaktion um die Plaques. Damit kann sie als geeignetes Modell zum Studium der Amyloidogenese und damit verbundener inflammatorischer Prozesse angesehen werden.

7 Summary

Margrit Klingner

Studies on biochemical and morphological changes in the brain of the transgenic mouse Tg2576 with β -amyloid pathology

Department of Anatomy, Histology and Embryology, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Paul Flechsig Institute of Brain Research, Department of Neurochemistry, Medical Faculty, University of Leipzig

Submitted in January 2004

Keywords: β -amyloid, transgenic mouse Tg2576, cholinergic system

88 pp., 38 fig., 7 tab., 225 ref., 1 appendix

Alzheimer's Disease (AD) is the most common form of dementia among the elderly in the Western world, with growing prevalence. In spite of intensive scientific and medical research, no possibility of early clinical diagnosis for this disease has yet been established.

In this thesis cholinergic and adrenergic parameters, as well as energy metabolism, were studied in the transgenic mouse model Tg2576, to reveal transgene-induced neurochemical and neuromorphological changes in the brain tissue of these animals. Also, the *ex vivo* labelling of marker molecules with a known high affinity for β -amyloid was to be tested. The objective was to further characterize the Tg2576 mouse strain as a model of AD, and to find plaque-associated marker molecules which could be used for the *in vivo* detection of β -amyloid plaques. Such findings could contribute to the development of new strategies for the early diagnosis of AD.

Quantitative receptor autoradiography, immunohistochemistry and *in situ* hybridization were the main biochemical and molecular biological methods employed. Furthermore, a radiochemical method was used for *ex vivo* labelling of acetylcholinesterase.

The 5 month-old transgenic mice, with no significant plaque load, demonstrated reduced [^3H]hemicholinium-3 binding to choline uptake sites in anterior brain regions, as compared to non-transgenic littermates. This provides evidence of the modulatory effect of soluble β -amyloid on high affinity choline uptake sites. However, a significant increase of [^3H]vesamicol receptor binding to the vesicular acetylcholine transporter was detected in 17 month-old transgenic animals, as compared to non-transgenic mice. Even though the opposite was expected, the result could be interpreted as an elevated vesicle density.

The immunohistochemical studies of α_4 and α_7 subunits of the nicotinic acetylcholine receptor revealed that neurons expressing these receptors do not undergo morphological changes in close proximity to β -amyloid plaques. There was no sign of degeneration in these neurons.

Concerning the examined parameters of glucose metabolism, no changes between transgenic animals and non-transgenic littermates were detected. This observation is in accordance with the data available in the literature, but in contrast to findings in AD patients. The density of brain capillaries in close vicinity of β -amyloid plaques, compared to a more distant surrounding, is reduced. This finding needs further examination because it could be relevant for *in vivo* diagnosis and therapy.

Comparing the transgenic Tg2576 mouse model to AD patients, it becomes apparent that the mouse model does not simulate all aspects of the pathogenesis of this disease. Consistent with the human disease this model is characterized by β -amyloid plaque production and deposition in the brain, as well as inflammatory processes around the plaques, which are also known in humans. Therefore, it represents a suitable model to study amyloidogenesis and inflammation.

8 Literaturverzeichnis

Adessi C, Frossard MJ, Boissard C, Fraga S, Bieler S, Ruckle T, et al. Pharmacological profiles of peptide drug candidates for the treatment of Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 2003; 278: 13905-11.

Agdeppa ED, Kepe V, Flores-Torres S, Satyamurthy S, Petric A, Cole GM, et al. Binding characteristics of radiofluorinated 6-dialkylamino-2-naphthylethylidene derivatives as positron emission tomography imaging probes for β -amyloid plaques in Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2001; 21: RC 189 1- 5.

Akiyama H, Barger S, Barnum S, Bradt B, Bauer J, Cole GM, et al. Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 2000; 21: 383-421.

Altar CA, Marien MR. [^3H]vesamicol binding in brain: autoradiographic distribution, pharmacology, and effects of cholinergic lesions. *Synapse*. 1988; 2: 486-93.

Andrä J, Lojda Z. A histochemical method for the demonstration of acetylcholinesterase activity using semipermeable membranes. *Histochemistry* 1986; 84: 575-9.

Apelt J, Kumar A, Schliebs R. Impairment of cholinergic neurotransmission in adult and aged transgenic Tg2576 mouse brain expressing the Swedish mutation of human beta-amyloid precursor protein. *Brain Res* 2002; 953: 17-30.

Apelt J, Schliebs R. Beta-amyloid-induced glial expression of both pro- and anti-inflammatory cytokines in cerebral cortex of aged transgenic Tg2576 mice with Alzheimer plaque pathology. *Brain Res* 2001; 894: 21-30.

Arendt T, Bigl V. Alzheimer's disease as a presumptive threshold phenomenon. *Neurobiol Aging*. 1987; 8: 552-4.

Auld DS, Kornecook TJ, Bastianetto S, Quirion R. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to beta-amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Prog Neurobiol* 2002; 68: 209-45.

Bauer J. Die Alzheimer Krankheit. Neurobiologie, Psychosomatik, Diagnostik und Therapie. Stuttgart, New York: Schattauer; 1994.

Bednar I, Paterson D, Marutle A, Pham TM, Svedberg M, Hellstrom-Lindahl E, et al. Selective nicotinic receptor consequences in APP(SWE) transgenic mice. *Mol Cell Neurosci* 2002; 20: 354-65.

Beeri R, Andres C, Lev-Lehman E, Timberg R, Huberman T, Shani M, et al. Transgenic expression of human acetylcholinesterase induces progressive cognitive deterioration in mice. *Curr Biol* 1995; 5: 1063-71.

Berger-Sweeney J, Stearns NA, Murg SL, Floerke-Nashner LR, Lappi DA, Baxter MG. Selective immunolesions of cholinergic neurons in mice: effects on neuroanatomy, neurochemistry, and behavior. *J Neurosci* 2001; 21: 8164-73.

Bickel, H. Demenzsyndrom und Alzheimer Krankheit: Eine Schätzung des Krankenbestandes und der jährlichen Neuerkrankungen in Deutschland. *Gesundheitswesen* 2000; 62: 211-8.

Bierer LM, Haroutunian V, Gabriel S, Knott PJ, Carlin LS, Purohit DP, et al. Neurochemical correlates of dementia severity in Alzheimer's disease: relative importance of the cholinergic deficits. *J Neurochem* 1995; 64: 749-60.

Biesold D, Inanami O, Sato A, Sato Y. Stimulation of the nucleus basalis of Meynert increases cerebral cortical blood flow in rats. *Neurosci Lett*. 1989; 98: 39-44.

Bigl M, Apelt J, Eschrich K, Schliebs R. Cortical glucose metabolism is altered in aged transgenic Tg2576 mice that demonstrate Alzheimer plaque pathology. *J Neural Transm* 2003; 110: 77-94.

Bigl M, Brückner MK, Arendt T, Bigl V, Eschrich K. Activities of key glycolytic enzymes in the brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1999;106: 499-511.

Bissette G, Seidler FJ, Nemeroff CB, Slotkin TA. High affinity choline transporter status in Alzheimer's disease tissue from rapid autopsy. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 777: 197-204.

Blusztajn JK, Berse B. The cholinergic neuronal phenotype in Alzheimer's disease. *Metab Brain Dis.* 2000; 15: 45-64.

Bondy CA, Lee WH, Zhou J. Ontogeny and cellular distribution of brain glucose transporter gene expression. *Mol Sll Neurosci.* 1992; 3: 305-314

Bonner TI, Buckley NJ, Young AC, Brann MR. Identification of a family of muscarinic acetylcholine receptor genes. *Science* 1987; 237: 527-32.

Bons N, Mestre N.: Similitudes entre les plaques amyloïdes cérébrales d'un lémurien âgé et de l'homme atteint de maladie d'Alzheimer. [Similarities between cerebral amyloid plaques in aged lemurian and in human with Alzheimer's disease] *C R Seances Soc Biol Fil* 1993; 187: 516-25.

Braak H, Braak E. Diagnostic criteria for neuropathologic assessment of Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997; 18 Suppl 4: 85-8.

Braida D, Sala M. Eptastigmine: ten years of pharmacology, toxicology, pharmacokinetic, and clinical studies. *CNS Drug Rev* 2001; 7: 369-86.

Browne SE, Lin L, Mattsson A, Georgievska B, Isacson O. Selective antibody-induced cholinergic cell and synapse loss produce sustained hippocampal and cortical hypometabolism with correlated cognitive deficits. *Exp Neurol.* 2001; 170: 36-47.

Burnett F. Etiology of Alzheimer's disease. In: Kelly C. Alzheimer's disease handbook, Basingstoke: Merit Publishing International; 2000. p.51-65.

Buttini M, Orth M, Bellosta S, Akeefe H, Pitas RE, Wyss-Coray T, Mucke L, et al. Expression of human apolipoprotein E3 or E4 in the brains of ApoE^{-/-} mice: isoform-specific effects on neurodegeneration. *J Neurosci*. 1999; 19: 4867-80.

BVMEL (Bundesministerium für Verbraucherschutz, Ernährung und Landwirtschaft). BMVEL-Informationen. 2002; Nr. 46/ 47

Callahan MJ, Lipinski WJ, Bian F, Durham RA, Pack A, Walker LC. Augmented senile plaque load in aged female beta-amyloid precursor protein-transgenic mice. *Am J Pathol* 2001; 158: 1173-7.

Capsoni S, Ugolini G, Comparini A, Ruberti F, Berardi N, Cattaneo A. Alzheimer-like neurodegeneration in aged antinerve growth factor transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97: 6826-31.

Caulfield NP, Birdsall NJM. International union of pharmacology. XVII. Classification of muscarinic acetylcholine receptors. *Pharmacol Rev* 1998; 50: 279-290.

Chartier-Harlin MC, Crawford F, Houlden H, Warren A, Hughes D, Fidani L, et al. Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nature* 1991; 353: 844-6.

Clark CM, Karlawish JH. Alzheimer disease: current concepts and emerging diagnostic and therapeutic strategies. *Ann Intern Med* 2003; 138: 400-10.

Corder EH, Saunders AM, Strittmatter WJ, Schmechel DE, Gaskell PC, Small GW, et al. Gene dose of apolipoprotein E type 4 allele and the risk of Alzheimer's disease in late onset families. *Science* 1993; 261: 921-3.

Coyle JT, Price DL, DeLong MR. Alzheimer's disease: a disorder of cortical cholinergic innervation. *Science* 1983; 219: 1184-90.

Cummings BJ, Head E, Afagh AJ, Milgram NW, Cotman CW: Beta-amyloid accumulation correlates with cognitive dysfunction in the aged canine. *Neurobiol Learn Mem* 1996; 66: 11-23.

D'Amato RJ, Zweig RM, Whitehouse PJ, Wenk GL, Singer HS, Mayeux R, et al. Aminergic systems in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Ann Neurol* 1987; 22: 229-36.

Davis KL, Mohs RC, Marin D, Purohit DP, Perl DP, Lantz M, et al. Cholinergic markers in elderly patients with early signs of Alzheimer disease. *JAMA* 1999; 281: 1401-6.

de Fiebre CM, Meyer EM, Henry JC, Muraskin SI, Kem WR, Papke RL. Characterization of a series of anabaseine-derived compounds reveals that the 3-(4)-dimethylaminocinnamylidene derivative is a selective agonist at neuronal nicotinic α 7/125I- α -bungarotoxin receptor subtypes. *Mol Pharmacol* 1995; 47: 164-71.

de la Torre JC. Alzheimer disease as a vascular disorder: nosological evidence. *Stroke* 2002; 33: 1152-62.

Dewachter I, van Dorpe J, Spittaels K, Tesseur I, Van Den Haute C, Moechars D, et al. Modeling Alzheimer's disease in transgenic mice: effect of age and of presenilin1 on amyloid biochemistry and pathology in APP/London mice. *Exp Gerontol* 2000; 35: 831-41.

Dineley KT, Westerman M, Bui D, Bell K, Ashe KH, Sweatt JD. Beta-amyloid activates the mitogen-activated protein kinase cascade via hippocampal α 7 nicotinic acetylcholine receptors: In vitro and in vivo mechanisms related to Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2001; 21: 4125-33.

Dodart JC, Mathis C, Bales KR, Paul SM, Ungerer A. Early regional cerebral glucose hypometabolism in transgenic mice overexpressing the V717F beta-amyloid precursor protein. *Neurosci Lett* 1999; 277: 49-52.

Drachman DA, Leavitt J.: Human memory and the cholinergic system. A relationship to aging? *Arch Neurol* 1974; 30: 113-21.

Duff K. Transgenic models of Alzheimer's disease neuropathology. In: Dawbarn D, Allen SJ, editors. *Neurobiology of Alzheimer's disease*. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2001. p. 241-51.

Eckman CB, Mehta ND, Crook R, Perez-tur J, Prihar G, Pfeiffer E, et al. A new pathogenic mutation in the APP gene (I716V) increases the relative proportion of A beta 42(43). *Hum Mol Genet* 1997; 6: 2087-9.

Edland SD, Wavrant-De Vriese F, Compton D, Smith GE, Ivnik R, et al. Insulin degrading enzyme (IDE) genetic variants and risk of Alzheimer's disease: evidence of effect modification by apolipoprotein E (APOE). *Neurosci Lett*. 2003; 345: 21-4.

Efange SM, Garland EM, Staley JK, Khare AB, Mash DC. Vesicular acetylcholine transporter density and Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997; 18: 407-13.

Farris W, Mansourian S, Chang Y, Lindsley L, Eckman EA, Frosch MP, et al. Insulin-degrading enzyme regulates the levels of insulin, amyloid beta-protein, and the beta-amyloid precursor protein intracellular domain in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 4162-7.

Flores CM, Rogers SW, Pabreza LA, Wolfe BB, Kellar KJ. A subtype of nicotinic cholinergic receptor in rat brain is composed of alpha 4 and beta 2 subunits and is up-regulated by chronic nicotine treatment. *Mol Pharmacol* 1992; 41: 31-7.

Francesconi M. Aspekte kardiovaskulärer Wirkungen von Sulfonylharnstoffen *J Kardiol* 2003;10 (Suppl C): 6-10.

Franklin KBJ, Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. San Diego: Academic Press Inc.; 1997.

Frautschy SA, Yang F, Irrizarry M, Hyman B, Saido TC, Hsiao K, et al. Microglial response to amyloid plaques in APPsw transgenic mice. *Am J Pathol* 1998;152: 307-17.

Frölich L, Blum-Degen D, Bernstein HG, Engelsberger S, Humrich J, Laufer S, et al. Brain insulin and insulin receptors in aging and sporadic Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1998;105: 423-38.

Gabuzda D, Busciglio J, Chen LB, Matsudaira P, Yankner BA. Inhibition of energy metabolism alters the processing of amyloid precursor protein and induces a potentially amyloidogenic derivative. *J Biol Chem* 1994; 269: 13623-8.

Games D, Adams D, Alessandrini R, Barbour R, Berthelette P, Blackwell C, et al. Alzheimer-type neuropathology in transgenic mice overexpressing V717F beta-amyloid precursor protein. *Nature* 1995; 373: 523-7.

Gasparini L, Racchi M, Benussi L, Curti D, Binetti G, Bianchetti A, et al. Effect of energy shortage and oxidative stress on amyloid precursor protein metabolism in COS cells. *Neurosci Lett* 1997; 231: 113-7.

Gau JT, Steinhilb ML, Kao TC, D'Amato CJ, Gaut JR, Frey KA, et al. Stable beta-secretase activity and presynaptic cholinergic markers during progressive central nervous system amyloidogenesis in Tg2576 mice. *Am J Pathol* 2002; 160: 731-738.

Giacobini E. Cholinesterases: new roles in brain function and in Alzheimer's disease. *Neurochem Res* 2003; 28: 515-22.

Giulian D, Haverkamp LJ, Li J, Karshin WL, Yu J, Tom D, et al. Senile plaques stimulate microglia to release a neurotoxin found in Alzheimer brain. *Neurochem Int* 1995; 27: 119-37.

Goffinet AM, Caviness VS Jr. Autoradiographic localization of beta 1 and alpha 1-adrenoceptors in the midbrain and forebrain of normal and reeler mutant mice. *Brain Res* 1986; 366: 193-202.

Götz J, Chen F, van Dorpe J, Nitsch RM. Formation of neurofibrillary tangles in P301L tau transgenic mice induced by A β 42 fibrils. *Science* 2001; 293: 1491-5.

Greenamyre JT, Penney JB, D'Amato CJ, Young AB. Dementia of the Alzheimer's type: changes in hippocampal L-[3H]glutamate binding. *J Neurochem* 1987; 48: 543-51.

Guan ZZ, Zhang X, Ravid R, Nordberg A. Decreased protein levels of nicotinic receptor subunits in the hippocampus and temporal cortex of patients with Alzheimer's disease. *Neurochem* 2000; 74: 237-43.

Gutierrez H, Miranda MI, Bermudez-Rattoni F. Learning impairment and cholinergic deafferentation after cortical nerve growth factor deprivation. *J Neurosci* 1997; 17: 3796-803.

Harris ME, Carney JM, Cole PS, Hensley K, Howard BJ, Martin L, et al. beta-Amyloid peptide-derived, oxygen-dependent free radicals inhibit glutamate uptake in cultured astrocytes: implications for Alzheimer's disease. *Neuroreport* 1995; 6: 1875-9

Härtig W, Klein C, Brauer K, Schuppel KF, Arendt T, Bruckner G, Bigl V. Abnormally phosphorylated protein tau in the cortex of aged individuals of various mammalian orders. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2000; 100: 305-12.

Hartlage-Rübsamen M, Apelt J, Schliebs R. Fibrillary beta-amyloid deposits are closely associated with atrophic nitric oxide synthase (NOS)-expressing neurons but do not upregulate the inducible NOS in transgenic Tg2576 mouse brain with Alzheimer pathology. *Neurosci Lett*. 2001; 302: 73-6

Hartley DM, Walsh DM, Ye CP, Diehl T, Vasquez S, Vassilev PM, et al. Protofibrillar intermediates of amyloid beta-protein induce acute electrophysiological changes and progressive neurotoxicity in cortical neurons. *J Neurosci* 1999; 19: 8876-84.

Heider M, Schliebs R, Rossner S, Bigl V. Basal forebrain cholinergic immunolesion by 192IgG-saporin: evidence for a presynaptic location of subpopulations of alpha 2- and beta-adrenergic as well as 5-HT_{2A} receptors on cortical cholinergic terminals. *Neurochem Res.* 1997; 22: 957-66.

Henderson VW. Oestrogens and dementia. *Novartis Found Symp* 2000; 230: 254-65.

Hendriks L, van Duijn CM, Cras P, Cruts M, Van Hul W, van Harskamp F, et al. Presenile dementia and cerebral haemorrhage linked to a mutation at codon 692 of the beta-amyloid precursor protein gene. *Nat Genet* 1992; 1: 218-21.

Hohmann CF, Coyle JT.: Long-term effects of basal forebrain lesions on cholinergic, noradrenergic and serotonergic markers in mouse neocortex. *Brain Res Bull* 1988; 21: 13-20.

Holcomb LA, Gordon MN, Jantzen P, Hsiao K, Duff K, Morgan D.: Behavioral changes in transgenic mice expressing both amyloid precursor protein and presenilin-1 mutations: lack of association with amyloid deposits. *Behav Genet* 1999; 29: 177-85.

Honer WG, Prohovnik I, Smith G, Lucas LR. Scopolamine reduces frontal cortex perfusion. *J Cereb Blood Flow Metab* 1988; 8:635-41.

Hoshi M, Takashima A, Murayama M, Yasutake K, Yoshida N, Ishiguro K, et al. Nontoxic amyloid beta peptide 1-42 suppresses acetylcholine synthesis. Possible role in cholinergic dysfunction in Alzheimer's disease. *J Biol Chem* 1997; 272: 2038-41.

Hoyer S, Nitsch R, Oesterreich K. Predominant abnormality in cerebral glucose utilization in late-onset dementia of the Alzheimer type: a cross-sectional comparison against advanced late-onset and incipient early-onset cases. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1991; 3: 1-14.

Hoyer S. Is sporadic Alzheimer disease the brain type of non-insulin dependent diabetes mellitus? A challenging hypothesis. *J Neural Transm* 1998; 105: 415-22.

Hoyer S. Brain glucose and energy metabolism abnormalities in sporadic Alzheimer disease. Causes and consequences: an update. *Exp Gerontol* 2000; 35: 1363-72.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y, Younkin S, et al. Correlative memory deficits, Abeta elevation, and amyloid plaques in transgenic mice. *Science* 1996; 274: 99-102.

Hsiao K, Chapman P, Nilsen S, Eckman C, Harigaya Y. et al.. Measuring memory in a mouse model of Alzheimer's disease. *Science* 1997; 277: 839-41.

Hsiao KK, Borchelt DR, Olson K, Johannsdottir R, Kitt C, Yunis W, et al. Age-related CNS disorder and early death in transgenic FVB/N mice overexpressing Alzheimer amyloid precursor proteins. *Neuron* 1995; 15: 1203-18.

Hughes SR, Khorkova O, Goyal S, Knaeblein J, Heroux J, Riedel NG, et al. Alpha2-macroglobulin associates with beta-amyloid peptide and prevents fibril formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998; 95: 3275-80.

Hutton M, Hardy J. The presenilins and Alzheimer's disease. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1639-46.

Hyman BT, Gomez-Isla T, Rebeck GW, Briggs M, Chung H, West HL, et al. Epidemiological, clinical, and neuropathological study of apolipoprotein E genotype in Alzheimer's disease. *Ann N Y Acad Sci* 1996; 802: 1-5.

Ikeda M, Dewar D, McCulloch J. High affinity hippocampal [3H]-glibenclamide binding sites are preserved in Alzheimer's disease. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1993; 5: 177-84.

Irie T, Fukushima K, Akimoto Y, Tamagami H, Nozaki T. Design and evaluation of radioactive acetylcholine analogs for mapping brain acetylcholinesterase (AChE) in vivo. *Nucl Med Biol* 1994; 21: 801-8.

Irizarry MC, Locascio JJ, Hyman BT. beta-site APP cleaving enzyme mRNA expression in APP transgenic mice: anatomical overlap with transgene expression and static levels with aging. *Am J Pathol* 2001; 158: 173-7.

Irizarry MC, McNamara M, Fedorchak K, Hsiao K, Hyman BT. APPSw transgenic mice develop age-related A beta deposits and neuropil abnormalities, but no neuronal loss in CA1. *J Neuropathol Exp Neurol* 1997; 56: 965-73.

Jagust W, Thisted R, Devous MD Sr, Van Heertum R, Mayberg H, Jobst K, et al. SPECT perfusion imaging in the diagnosis of Alzheimer's disease: a clinical-pathologic study. *Neurology* 2001; 56: 950-6.

Janus C, Westaway D. Transgenic mouse models of Alzheimer's disease. *Physiol Behav* 2001; 73: 873-86.

Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer's disease. *Biochemistry* 1993; 32: 4693-7.

Jiang H, Burdick D, Glabe CG, Cotman CW, Tenner AJ. beta-Amyloid activates complement by binding to a specific region of the collagen-like domain of the C1q A chain. *J Immunol* 1994; 152: 5050-9.

Joseph J, Shukitt-Hale B, Denisova NA, Martin A, Perry G, Smith MA. Copernicus revisited: amyloid beta in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 2001; 22: 131-46.

Jost BC, Grossberg GT. The evolution of psychiatric symptoms in Alzheimer's Disease: a natural history study. *J Am Geriatr Soc* 1996; 44: 1078-81.

Kalaria RN, Andorn AC, Tabaton M, Whitehouse PJ, Harik SI, Unnerstall JR. Adrenergic receptors in aging and Alzheimer's disease: increased beta 2-receptors in prefrontal cortex and hippocampus. *J Neurochem* 1989; 53: 1772-81.

Kalback W, Watson MD, Kokjohn TA, Kuo YM, Weiss N, Luehrs DC, et al. APP transgenic mice Tg2576 accumulate Abeta peptides that are distinct from the chemically modified and insoluble peptides deposited in Alzheimer's disease senile plaques. *Biochemistry* 2002; 41: 922-8.

Kar S, Issa AM, Seto D, Auld DS, Collier B, Quirion R. Amyloid beta-peptide inhibits high-affinity choline uptake and acetylcholine release in rat hippocampal slices. *J Neurochem* 1998; 70: 2179-87.

Kar S, Seto D, Gaudreau P, Quirion R. Beta-amyloid-related peptides inhibit potassium-evoked acetylcholine release from rat hippocampal slices *J Neurosci* 1996; 16: 1034-40.

Kasa P, Rakonczay Z, Gulya K. The cholinergic system in Alzheimer's disease. *Prog Neurobiol* 1997; 52: 511-35.

Kawai H, Zago W, Berg DK. Nicotinic α_7 receptor clusters on hippocampal GABAergic neurons: regulation by synaptic activity and neurotrophins. *J Neurosci* 2002; 22: 7903-12.

Kawai M, Kalaria RN, Harik SI, Perry G. The relationship of amyloid plaques to cerebral capillaries in Alzheimer's disease. *Am J Pathol* 1990; 137: 1435-46.

Kelly JF, Furukawa K, Barger SW, Rengen MR, Mark RJ, Blanc EM, et al. Amyloid beta-peptide disrupts carbachol-induced muscarinic cholinergic signal transduction in cortical neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 6753-8.

Kelly C. The clinical features of Alzheimer's disease. In: Kelly C. *Alzheimer's disease handbook*, Basingstoke: Merit Publishing International; 2000. p. 11-15

King DL, Arendash GW, Crawford F, Sterk T, Menendez J, Mullan MJ. Progressive and gender-dependent cognitive impairment in the APP(SW) transgenic mouse model for Alzheimer's disease. *Behav Brain Res* 1999; 103: 145-62.

Kish SJ, Distefano LM, Dozic S, Robitaille Y, Rajput A, Deck JH, et al. [³H]vesamicol binding in human brain cholinergic deficiency disorders. *Neurosci Lett* 1990; 117: 347-52.

Klein AM, Kowall NW, Ferrante RJ. Neurotoxicity and oxidative damage of beta amyloid 1-42 versus beta amyloid 1-40 in the mouse cerebral cortex. *Ann N Y Acad Sci* 1999; 893:314-20.

Kristofikova Z, Fales E, Majer E, Klaschka J. [³H]hemicholinium-3 binding sites in postmortem brains of human patients with Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Exp Gerontol* 1995; 30: 125-36.

Kristofikova Z, Tejkalova H, Klaschka J. Amyloid beta peptide 1-40 and the function of rat hippocampal hemicholinium-3 sensitive choline carriers: effects of a proteolytic degradation in vitro. *Neurochem Res* 2001; 26: 203-12.

Krügel U, Bigl V, Eschrich K, Bigl M. Deafferentation of the septo-hippocampal pathway in rats as a model of the metabolic events in Alzheimer's disease. *Int J Dev Neurosci* 2001; 19: 263-77.

Kurochkin IV, Goto S. Alzheimer's beta-amyloid peptide specifically interacts with and is degraded by insulin degrading enzyme. *FEBS Lett* 1994; 345: 33-7.

Kurz A, Riemenschneider M, Drzezga M, Lautenschlager N. The role of biological markers in the early and differential diagnosis of alzheimer's disease. *J Neural Transm* 2002; (Suppl) 62: 127-33.

Le Novère N, Changeux JP. Molecular evolution of the nicotinic acetylcholine receptor: an example of multigene family in excitable cells. *J Mol Evol* 1995; 40: 155-172.

Levin BE, Dunn-Meynell AA. In vivo and in vitro regulation of [³H]glyburide binding to brain sulfonylurea receptors in obesity-prone and resistant rats by glucose. *Brain Res.* 1997; 776: 146-53.

Levy-Lahad E, Wasco W, Poorkaj P, Romano DM, Oshima J, Pettingell WH, et al. Candidate gene for the chromosome 1 familial Alzheimer's disease locus. *Science* 1995; 269: 973-7.

Lewis J, McGowan E, Rockwood J, Melrose H, Nacharaju P, Van Slegtenhorst M, et al. Neurofibrillary tangles, amyotrophy and progressive motor disturbance in mice expressing mutant (P301L) tau protein. *Nat Genet* 2000b; 25: 402-5.

Lewis J, Dickson DW, Lin WL, Chisholm L, Corral A, Jones G, et al. Enhanced neurofibrillary degeneration in transgenic mice expressing mutant tau and APP. *Science* 2001; 293: 1487-91.

Lewis PA, Perez-Tur J, Golde TE, Hardy J. The presenilin 1 C92S mutation increases abeta 42 production. *Biochem Biophys Res Commun* 2000a; 277: 261-3.

Li M, Smith CP. Beta-amyloid 1-40 inhibits electrically stimulated release of [³H]norepinephrine and enhances the internal calcium response to low potassium in rat cortex: prevention with a free radical scavenger. *Brain Res Bull* 1996; 39: 299-303.

Lim F, Hernandez F, Lucas JJ, Gomez-Ramos P, Moran MA, Avila J.: FTDP-17 mutations in tau transgenic mice provoke lysosomal abnormalities and Tau filaments in forebrain. *Mol Cell Neurosci* 2001; 18: 702-14.

Liss B, Roeper J. A role for neuronal K_{ATP} channels in metabolic control of the seizure gate. *Trends Pharmacol Sci* 2001; 22: 599-601.

Liu L, Ikonen S, Tapiola T, Tanila H, van Groen T. Fimbria-fornix lesion does not affect APP levels and amyloid deposition in the hippocampus of APP+PS1 double transgenic mice. *Exp Neurol* 2002; 177: 565-74.

Lockman PR, Allen DD. The transport of choline. *Drug Dev Ind Pharm* 2002; 28: 749-71.

Lukoyanov NV, Andrade JP, Dulce Madeira M, Paula-Barbosa MM. Effects of age and sex on the water maze performance and hippocampal cholinergic fibers in rats. *Neurosci Lett* 1999; 269: 141-4.

Lüth HJ, Apelt J, Ihunwo AO, Arendt T, Schliebs R. Degeneration of beta-amyloid-associated cholinergic structures in transgenic APP SW mice. *Brain Res.* 2003; 977: 16-22.

Martin-Ruiz CM, Court JA, Molnar E, Lee M, Gotti C, Mamalaki A, et al. Alpha4 but not alpha3 and alpha7 nicotinic acetylcholine receptor subunits are lost from the temporal cortex in Alzheimer's disease. *J Neurochem.* 1999; 73: 1635-40.

Marutle A, Unger C, Hellstrom-Lindahl E, Wang J, Puolivali J, Tanila H, et al. Elevated levels of Abeta1-40 and Abeta1-42 do not alter the binding sites of nicotinic receptor subtypes in the brain of APPswe and PS1 double transgenic mice. *Neurosci Lett* 2002; 328: 269-72.

Mattson MP. Cellular actions of beta-amyloid precursor protein and its soluble and fibrillogenic derivatives. *Physiol Rev* 1997; 77: 1081-132.

Mattson MP. Neurobiology: Ballads of a protein quartet. *Nature* 2003; 422: 385-7.

Mayeux R, Ottman R, Maestre G, Ngai C, Tang MX, Ginsberg H, et al. Synergistic effects of traumatic head injury and apolipoprotein-epsilon 4 in patients with Alzheimer's disease. *Neurology* 1995; 45: 555-7.

McGeer PL, McGeer EG, Yasojima K. Alzheimer disease and neuroinflammation. *J Neural Transm Suppl* 2000; 59: 53-7.

Meana JJ, Barturen F, Garro MA, Garcia-Sevilla JA, Fontan A, Zarranz JJ. Decreased density of presynaptic alpha 2-adrenoceptors in postmortem brains of patients with Alzheimer's disease. *J Neurochem* 1992; 58: 1896-904.

Mega MS. Differential diagnosis of dementia: clinical examination and laboratory assessment. *Clin Cornerstone* 2002; 4: 53-65.

Mesulam MM. The systems-level organization of cholinergic innervation in the human cerebral cortex and its alterations in Alzheimer's disease. *Prog Brain Res* 1996; 109: 285-97.

Miyakawa T, Uehara Y, Desaki J, Kimura T, Kuramoto R. Morphological changes of microvessels in the brain with Alzheimer's disease. *Jpn J Psychiatry Neurol* 1988; 42: 819-24.

Moechars D, Dewachter I, Lorent K, Reverse D, Baekelandt V., Nadiu A. et al. Early phenotypic changes in transgenic mice that overexpress different mutants of amyloid precursor protein in brain. *J. Biol. Chem* 1999; 274, 6483-92.

Muir JL, Everitt BJ, Robbins TW. Reversal of visual attentional dysfunction following lesions of the cholinergic basal forebrain by physostigmine and nicotine but not by the 5-HT₃ receptor antagonist, ondansetron. *Psychopharmacology (Berl)* 1995; 118: 82-92.

Mullan M, Crawford F, Axelman K, Houlden H, Lilius L, Winblad B, et al. Pathogenic mutation for probable Alzheimer's disease in the APP gene at the N-terminus of beta-amyloid. *Nat Genet* 1992;1: 345-7.

Mulugeta E, Karlsson E, Islam A, Kalaria R, Mangat H, Winblad B, et al. Loss of muscarinic M4 receptors in hippocampus of Alzheimer patients. *Brain Res* 2003; 960: 259-62.

Murakami K, Irie K, Morimoto A, Ohigashi H, Shindo M, Nagao M, Shimizu T, Shirasawa T. Synthesis, aggregation, neurotoxicity, and secondary structure of various A beta 1-42 mutants of familial Alzheimer's disease at positions 21-23. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 294: 5-10.

Murrell J, Farlow M, Ghetti B, Benson MD. A mutation in the amyloid precursor protein associated with hereditary Alzheimer's disease. *Science* 1991; 254: 97-9.

Nakahara N, Iga Y, Mizobe F, Kawanishi G.: Amelioration of experimental amnesia (passive avoidance failure) in rodents by the selective M1 agonist AF102B. *Jpn J Pharmacol* 1988; 48: 502-6.

Namba H, Irie T, Fukushi K, Iyo M. In vivo measurement of acetylcholinesterase activity in the brain with a radioactive acetylcholine analog. *Brain Res* 1994; 667: 278-82.

Naruse S, Igarashi S, Kobayashi H, Aoki K, Inuzuka T, Kaneko K, et al. Mis-sense mutation Val--Ile in exon 17 of amyloid precursor protein gene in Japanese familial Alzheimer's disease. *Lancet* 1991; 337: 978-9.

Nebu A, Ikeda M, Fukuhara R, Shigenobu K, Maki N, Hokoishi K, et al. Relationship between blood flow kinetics and severity of Alzheimer's disease: assessment of severity using a questionnaire-type examination, Alzheimer's disease assessment scale, cognitive sub-scale (ADAS(cog)). *Dement Geriatr Cogn Disord* 2001; 12: 318-25.

Nilsberth C, Westlind-Danielsson A, Eckman CB, Condrón MM, Axelman K, Forsell C, et al. The 'Arctic' APP mutation (E693G) causes Alzheimer's disease by enhanced Abeta protofibril formation. *Nat Neurosci* 2001; 4: 887-93.

Niwa K, Kazama K, Younkin SG, Carlson GA, Iadecola C. Alterations in cerebral blood flow and glucose utilization in mice overexpressing the amyloid precursor protein. *Neurobiol Dis* 2002; 9: 61-8.

Nordberg A, Lundqvist H, Hartvig P, Lilja A, Langstrom B. Kinetic analysis of regional (S)(-)-¹¹C-nicotine binding in normal and Alzheimer brains--in vivo assessment using positron emission tomography. *Alzheimer Dis Assoc Disord* 1995; 9: 21-7.

Nordberg A. Nicotinic receptor abnormalities of Alzheimer's disease: therapeutic implications. *Biol Psychiatry* 2001; 49: 200-10.

Nowak G, Silberring J. Kinetics of [³H]-prazosin binding to the rat cortex during aging. *Pharmacol Biochem Behav.* 1988; 31: 505-7.

Parpura-Gill A, Beitz D, Uemura E. The inhibitory effects of beta-amyloid on glutamate and glucose uptakes by cultured astrocytes. *Brain Res* 1997; 754: 65-71.

Pedersen WA, Kloczewiak MA, Blusztajn JK. Amyloid beta-protein reduces acetylcholine synthesis in a cell line derived from cholinergic neurons of the basal forebrain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93: 8068-71.

Pericak-Vance MA, Bass MP, Yamaoka LH, Gaskell PC, Scott WK, Terwedow HA, et al. Complete genomic screen in late-onset familial Alzheimer disease. Evidence for a new locus on chromosome 12. *JAMA* 1997; 278: 1237-41.

Permanne B, Adessi C, Saborio GP, Fraga S, Frossard MJ, Van Dorpe J, et al. Reduction of amyloid load and cerebral damage in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease by treatment with a beta-sheet breaker peptide. *FASEB J* 2002; 16: 860-2.

Pettit DL, Shao Z, Yakel JL. beta-Amyloid(1-42) peptide directly modulates nicotinic receptors in the rat hippocampal slice. *J Neurosci* 2001; 21: RC120.

Pike CJ, Burdick D, Walencewicz AJ, Glabe CG and Cotman CW. Neurodegeneration induced by beta-amyloid peptides in vitro: the role of peptide assembly state. *J Neurosci* 1993;13: 1676-87.

Pratico D, Uryu K, Leight S, Trojanowski JQ, Lee VM. Increased lipid peroxidation precedes amyloid plaque formation in an animal model of Alzheimer amyloidosis. *J Neurosci* 2001; 21: 4183-7.

Price DL, Tanzi RE, Borchelt DR, Sisodia SS. Alzheimer's disease: Genetic studies and transgenic Models. *Annu Rev Genet* 1998; 32: 461-93.

Quinn J, Davis F, Woodward WR, Eckenstein F. Beta-amyloid plaques induce neuritic dystrophy of nitric oxide-producing neurons in a transgenic mouse model of Alzheimer's disease. *Exp Neurol* 2001; 168: 203-12.

Reinikainen KJ, Paljarvi L, Huuskonen M, Soininen H, Laakso M, Riekkinen PJ. A post-mortem study of noradrenergic, serotonergic and GABAergic neurons in Alzheimer's disease. *J Neurol Sci* 1988; 84: 101-16.

Richard F, Amouyel P. Genetic susceptibility factors for Alzheimer's disease. *Eur J Pharmacol*. 2001; 412: 1-12.

Richter JA, Perry EK and Tomlinson BE. Acetylcholine and choline levels in post-mortem human brain tissue: Preliminary observations in Alzheimer's disease. *Life Sci* 1980; 26: 1683-9.

Rodriguez-Puertas R, Pazos A, Zarranz JJ, Pascual J. Selective cortical decrease of high-affinity choline uptake carrier in Alzheimer's disease: an autoradiographic study using [³H] hemicholinium-3. *J Neural Transm Park Dis Dement Sect* 1994; 8: 161-9.

Role LW, Berg DK. Nicotinic receptors in the development and modulation of CNS synapses. *Neuron* 1996; 16: 1077-85.

Rossner S, Apelt J, Schliebs R, Perez-Polo JR, Bigl V. Neuronal and glial beta-secretase (BACE) protein expression in transgenic Tg2576 mice with amyloid plaque pathology. *J Neurosci Res* 2001; 64: 437-46.

Rossner S, Schliebs R, Hartig W, Bigl V. 192IGG-saporin-induced selective lesion of cholinergic basal forebrain system: neurochemical effects on cholinergic neurotransmission in rat cerebral cortex and hippocampus. *Brain Res Bull.* 1995; 38: 371-81.

Rossner S, Ueberham U, Schliebs R, Perez-Polo JR, Bigl V. The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. *Prog Neurobiol* 1998; 56: 541-69.

Ruberti F, Capsoni S, Comparini A, Di Daniel E, Franzot J, Gonfloni S, et al. Phenotypic knockout of nerve growth factor in adult transgenic mice reveals severe deficits in basal forebrain cholinergic neurons, cell death in the spleen, and skeletal muscle dystrophy. *J Neurosci* 2000; 20: 2589-601.

Ruberg M, Mayo W, Brice A, Duyckaerts C, Hauw JJ, Simon H, et al. Choline acetyltransferase activity and [3H]vesamicol binding in the temporal cortex of patients with Alzheimer's disease, Parkinson's disease, and rats with basal forebrain lesions. *Neuroscience.* 1990 ;35: 327-33.

Russo-Neustadt A, Cotman CW. Adrenergic receptors in Alzheimer's disease brain: selective increases in the cerebella of aggressive patients. *J Neurosci* 1997; 17: 5573-80.

Sabbagh MN, Reid RT, Corey-Bloom J, Rao TS, Hansen LA, Alford M, et al. Correlation of nicotinic binding with neurochemical markers in Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 1998; 105: 709-17.

Saitoh T, Mook-Jung I. Is Understanding the Biological Function of APP Important in Understanding Alzheimer's Disease? *J Alzheimers Dis.* 1999; 1: 287-295.

Scali C, Prosperi C, Giovannelli L, Bianchi L, Pepeu G, Casamenti F. Beta(1-40) amyloid peptide injection into the nucleus basalis of rats induces microglia reaction and enhances cortical gamma-aminobutyric acid release in vivo. *Brain Res.* 1999; 831: 319-21.

Schliebs R, Bigl V. Animal models to produce cortical cholinergic dysfunction. In: Perez-Polo RJ editor. *Pragdigms of neural injury*. San Diego Academic Press, Inc.; 1996. p. 275-289.

Schmidt DR. *Taschenatlas der Biotechnologie und Genetik*. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH; 2002. p. 158-9.

Schneider C, Risser D, Kirchner L, Kitzmuller E, Cairns N, Prast H, et al. Similar deficits of central histaminergic system in patients with Down syndrome and Alzheimer disease. *Neurosci Lett* 1997; 222: 183-6.

Schröder H Wevers A. Nicotinic acetylcholine receptores in Alzheimer's disease. *Alzheimer's Disease Review* 1998; 3: 20-7.

Seo H, Ferree AW, Isacson O. Cortico-hippocampal APP and NGF levels are dynamically altered by cholinergic muscarinic antagonist or M1 agonist treatment in normal mice. *Eur J Neurosci* 2002; 15: 498-506.

Sherrington R, Rogaev EI, Liang Y, Rogaeva EA, Levesque G, Ikeda M, et al. Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature* 1995; 375: 754-60.

Shimohama S, Kihara T. Nicotinic receptor-mediated protection against beta-amyloid neurotoxicity. *Biol Psychiatry* 2001; 49: 233-9.

Shimohama S, Taniguchi T, Fujiwara M, Kameyama M. Biochemical characterization of alpha-adrenergic receptors in human brain and changes in Alzheimer-type dementia. *J Neurochem* 1986; 47: 1295-301.

Siegel GJ, Chauhan NB. Neurotrophic factors in Alzheimer's and Parkinson's disease brain. *Brain Res Brain Res Rev.* 2000; 33: 199-227.

Sihver W, Gunther P, Schliebs R, Bigl V. Repeated administration of tacrine to normal rats: effects on cholinergic, glutamatergic, and GABAergic receptor subtypes in rat brain using receptor autoradiography. *Neurochem Int.* 1997; 31: 693-703.

Sihver W, Gillberg PG, Svensson AL, Nordberg A. Autoradiographic comparison of [³H](−)nicotine, [³H]cytisine and [³H]epibatidine binding in relation to vesicular acetylcholine transport sites in the temporal cortex in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 1999; 94: 685-96.

Sims NR, Bowen DM, Smith CC, Flack RH, Davison AN, Snowden JS, et al. Glucose metabolism and acetylcholine synthesis in relation to neuronal activity in Alzheimer's disease. *Lancet* 1980; 1: 333-6.

Smith MA, Hirai K, Hsiao K, Pappolla MA, Harris PL, Siedlak SL, et al. Amyloid-beta deposition in Alzheimer transgenic mice is associated with oxidative stress. *J Neurochem* 1998; 70: 2212-5.

Soto C, Kindy MS, Baumann M, Frangione B. Inhibition of Alzheimer's amyloidosis by peptides that prevent beta-sheet conformation. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 226: 672-80.

Soto C, Sigurdsson EM, Morelli L, Kumar RA, Castano EM, Frangione B. Beta-sheet breaker peptides inhibit fibrillogenesis in a rat brain model of amyloidosis: implications for Alzheimer's therapy. *Nat Med.* 1998; 4: 822-6.

Sparks DL, Beach TG, Lukas RJ. Immunohistochemical localization of nicotinic beta2 and alpha4 receptor subunits in normal human brain and individuals with Lewy body and Alzheimer's disease: preliminary observations. *Neurosci Lett* 1998; 256:151-4.

St George-Hyslop PH. Molecular genetics of Alzheimer's disease. *Biol Psychiatry.* 2000; 47: 183-99.

Stone DJ, Rozovsky I, Morgan TE, Anderson CP, Finch CE. Increased synaptic sprouting in response to estrogen via an apolipoprotein E-dependent mechanism: implications for Alzheimer's disease. *J Neurosci* 1998; 18: 3180-5.

Sturchler-Pierrat C, Abramowski D, Duke M, Wiederhold KH, Mistl C, Rothacher S, et al. Two amyloid precursor protein transgenic mouse models with Alzheimer disease-like pathology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 13287-92.

Tang MX, Jacobs D, Stern Y, Marder K, Schofield P, Gurland B, et al. Effect of oestrogen during menopause on risk and age at onset of Alzheimer's disease. *Lancet* 1996; 348: 429-32.

Teaktong T, Graham A, Court J, Perry R, Jaros E, Johnson M, et al. Alzheimer's disease is associated with a selective increase in alpha7 nicotinic acetylcholine receptor immunoreactivity in astrocytes. *Glia* 2003; 41: 207-11.

Terai K, Iwai A, Kawabata S, Tasaki Y, Watanabe T, Miyata K, et al. Beta-amyloid deposits in transgenic mice expressing human beta-amyloid precursor protein have the same characteristics as those in Alzheimer's disease. *Neuroscience* 2001; 104: 299-310.

Tjernberg LO, Naslund J, Lindqvist F, Johansson J, Karlstrom AR, Thyberg J, et al. Arrest of beta-amyloid fibril formation by a pentapeptide ligand. *J Biol Chem* 1996; 271: 8545-8.

Tohgi H, Yonezawa H, Takahashi S, Sato N, Kato E, Kudo M, et al. Cerebral blood flow and oxygen metabolism in senile dementia of Alzheimer's type and vascular dementia with deep white matter changes. *Neuroradiology* 1998; 40: 131-7.

Tomidokoro Y, Harigaya Y, Matsubara E, Ikeda M, Kawarabayashi T, Shirao T, et al. Brain Abeta amyloidosis in APPsw mice induces accumulation of presenilin-1 and tau. *J Pathol*. 2001; 194: 500-6.

Tonini G, Shanks MF, Venneri A. Short-term longitudinal evaluation of cerebral blood flow in mild Alzheimer's disease. *Neurol Sci* 2003; 24: 24-30.

Tucker SP, Cunningham VJ. Autoradiography of [^3H]cytochalasin B binding in rat brain. *Brain Res.* 1988; 450: 131-6.

Turnbull S, Tabner BJ, El-Agnaf OM, Twyman LJ, Allsop D. New evidence that the Alzheimer beta-amyloid peptide does not spontaneously form free radicals: an ESR study using a series of spin-traps. *Free Radic Biol Med.* 2001; 30: 1154-62.

Ushijima Y, Okuyama C, Mori S, Nakamura T, Kubota T, Nishimura T. Relationship between cognitive function and regional cerebral blood flow in Alzheimer's disease. *Nucl Med Commun* 2002; 23: 779-84.

Vamvakides A. Mécanisme d'action de la tétrahydro-N, N-diméthyl-5, 5-diphényl-3-furanéméthanamine, un dérivé potentiellement nootrope, antiépileptique et antidépresseur. [Mechanism of action of tetrahydro-N, N-dimethyl-5, 5-diphenyl-3-furanemethanamine, a putative nootropic, anti-epileptic and antidepressant compound] *Ann Pharm Fr* 2002; 60: 415-22.

Vannucci SJ, Maher F, Simpson IA. Glucose transporter proteins in brain: delivery of glucose to neurons and glia. *Glia* 1997; 21: 2-21.

Wang HY, Lee DH, D'Andrea MR, Peterson PA, Shank RP, Reitz AB. beta-Amyloid(1-42) binds to alpha7 nicotinic acetylcholine receptor with high affinity. Implications for Alzheimer's disease pathology. *J Biol Chem* 2000; 275: 5626-32.

Wasco W. Molecular genetics of Alzheimer's disease. In: Dawbarn D, Allen S.J, editors. *Neurobiology of Alzheimer's disease*. 2nd ed. New York: Oxford University Press; 2001. p.54-74.

Webster S, Lue LF, Brachova L, Tenner AJ, McGeer PL, Terai K, et al. Molecular and cellular characterization of the membrane attack complex, C5b-9, in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 1997; 18: 415-21.

Wegiel J, Wang KC, Imaki H, Rubenstein R, Wronska A, Osuchowski M, et al. The role of microglial cells and astrocytes in fibrillar plaque evolution in transgenic APP(SW) mice. *Neurobiol Aging* 2001; 22: 49-61.

Wenk H, Bigl V, Meyer U. Cholinergic projections from magnocellular nuclei of the basal forebrain to cortical areas in rats. *Brain Res.* 1980; 2: 295-316.

Westerman MA, Cooper-Blacketer D, Mariash A, Kotilinek L, Kawarabayashi T, Younkin LH, et al. The relationship between Abeta and memory in the Tg2576 mouse model of Alzheimer's disease. *J Neurosci* 2002; 22: 1858-67.

White F, Nicoll JA, Roses AD, Horsburgh K. Impaired neuronal plasticity in transgenic mice expressing human apolipoprotein E4 compared to E3 in a model of entorhinal cortex lesion. *Neurobiol Dis* 2001; 8: 611-25.

Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science* 1982; 215: 1237-9.

Wiley RG. Neural lesioning with ribosome-inactivating proteins: suicide transport and immunolesioning. *Trends Neurosci* 1992; 15: 285-90.

Wiltfang J, Esselmann H, Maler JM, Bleich S, Huther G, Kornhuber J. Molecular biology of Alzheimer's dementia and its clinical relevance to early diagnosis and new therapeutic strategies. *Gerontology* 2001; 47: 65-71.

Woolf NJ, Milov AM, Schweitzer ES, Roghani A. Elevation of nerve growth factor and antisense knockdown of TrkA receptor during contextual memory consolidation. *J Neurosci* 2001; 21: 1047-55.

Wu D, Yang J, Pardridge M. Drug targeting of a peptide radiopharmaceutical through the primate blood-brain barrier in vivo with a monoclonal antibody to the human insulin receptor. *J Clin Invest* 1997; 100: 1804-12.

Wurtman RJ. Choline metabolism as a basis for the selective vulnerability of cholinergic neurons. *Trends Neurosci* 1992; 15: 117-22.

Xie L, Helmerhorst E, Taddei K, Plewright B, Van Bronswijk W, Martins R. Alzheimer's beta-amyloid peptides compete for insulin binding to the insulin receptor. *J Neurosci* 2002; 22: RC221.

Yamaguchi S, Meguro K, Itoh M, Hayasaka C, Shimada M, Yamazaki H, et al. Decreased cortical glucose metabolism correlates with hippocampal atrophy in Alzheimer's disease as shown by MRI and PET. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 1997; 62: 596-600.

Yankner BA, Dawes LR, Fisher S, Villa-Komaroff L, Oster-Granite ML, Neve RL. Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science* 1989; 245: 417-20.

Zhu YJ, Lin H, Lal R. Fresh and nonfibrillar amyloid beta protein(1-40) induces rapid cellular degeneration in aged human fibroblasts: evidence for AbetaP-channel-mediated cellular toxicity. *FASEB J* 2000; 14: 1244-54.

Zilles K, Gross G, Schleicher A, Schildgen S, Bauer A, Bahro M, et al. Regional and laminar distributions of alpha 1-adrenoceptors and their subtypes in human and rat hippocampus. *Neuroscience* 1991; 40: 307-20.

Zini S, Tremblay E, Pollard H, Moreau J, Ben-Ari Y. Regional distribution of sulfonylurea receptors in the brain of rodent and primate. *Neuroscience* 1993; 55: 1085-91.

Zlokovic BV. Vascular disorder in Alzheimer's disease: role in pathogenesis of dementia and therapeutic targets. *Adv Drug Deliv Rev* 2002; 54: 1553-9.

9 Anhang

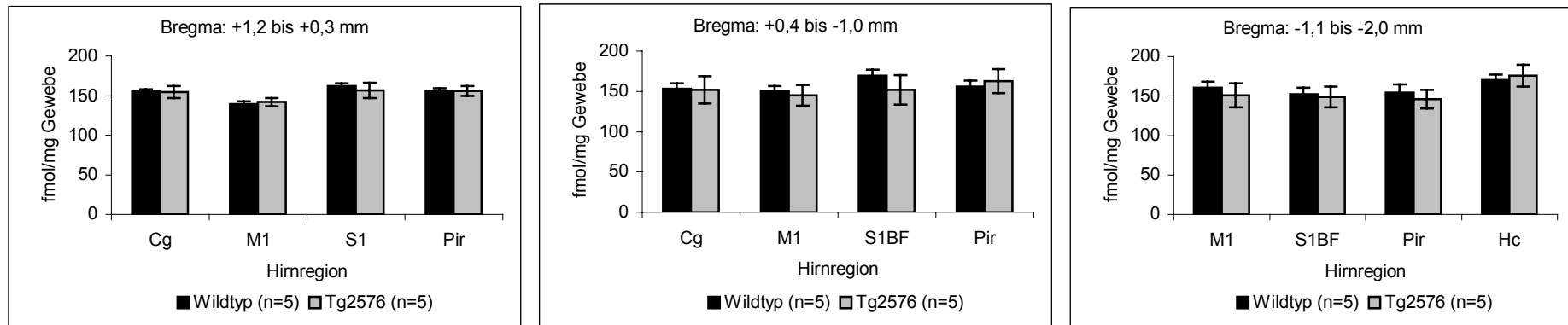


Abb. 1: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Vesamicol-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 5 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in fmol/mg Gewebe $\pm S_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standard-abweichung vom Mittelwert.

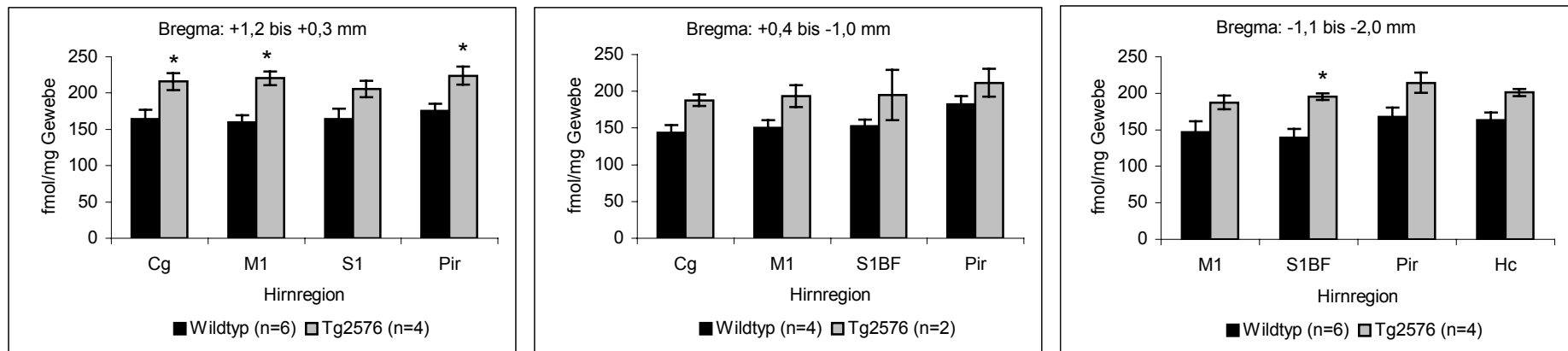


Abb. 2: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Vesamicol-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in fmol/mg Gewebe $\pm S_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standard-abweichung vom Mittelwert.

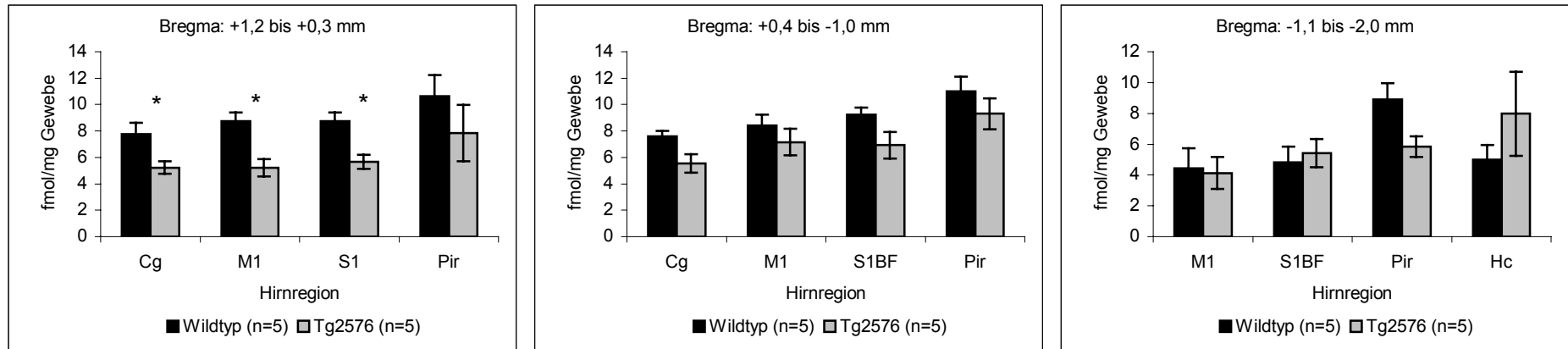


Abb. 3: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Hemicholinium-3-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 5 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in fmol/mg Gewebe $\pm S_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

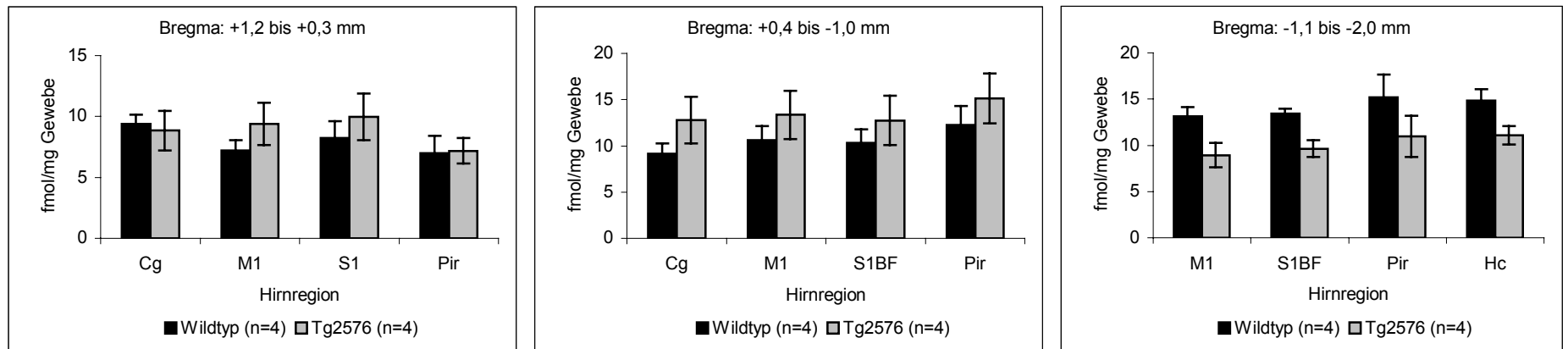


Abb. 4: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Hemicholinium-3-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in fmol/mg Gewebe $\pm S_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

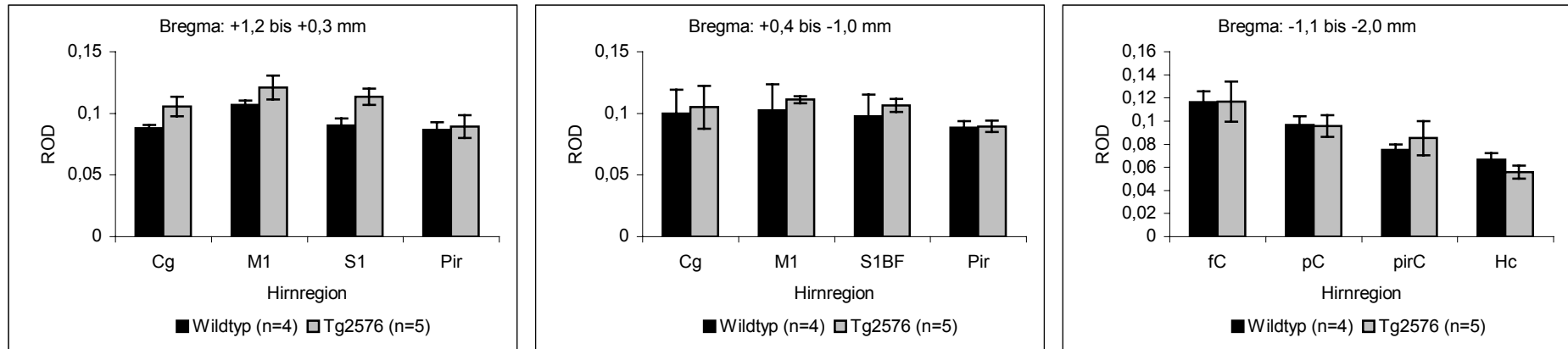


Abb. 5: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^{35}S]m $_3$ muskarinische Rezeptor mRNA-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 5 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in ROD (relative optische Dichte) \pm S $_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

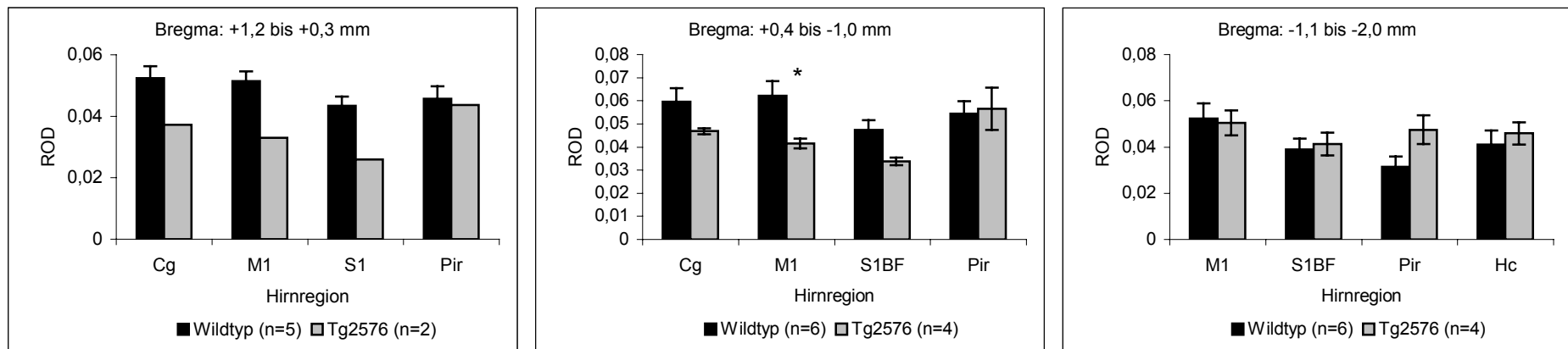


Abb. 6: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^{35}S]m $_3$ muskarinische Rezeptor mRNA-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in ROD (relative optische Dichte) \pm S $_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

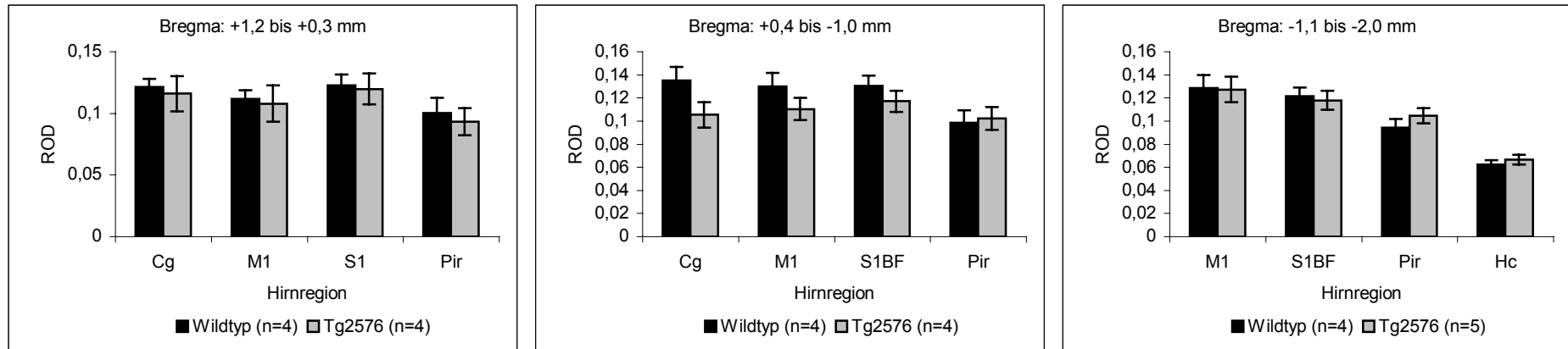


Abb. 7: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^{35}S]m $_4$ muskarinische Rezeptor mRNA-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 5 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in ROD (relative optische Dichte) \pm S $_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

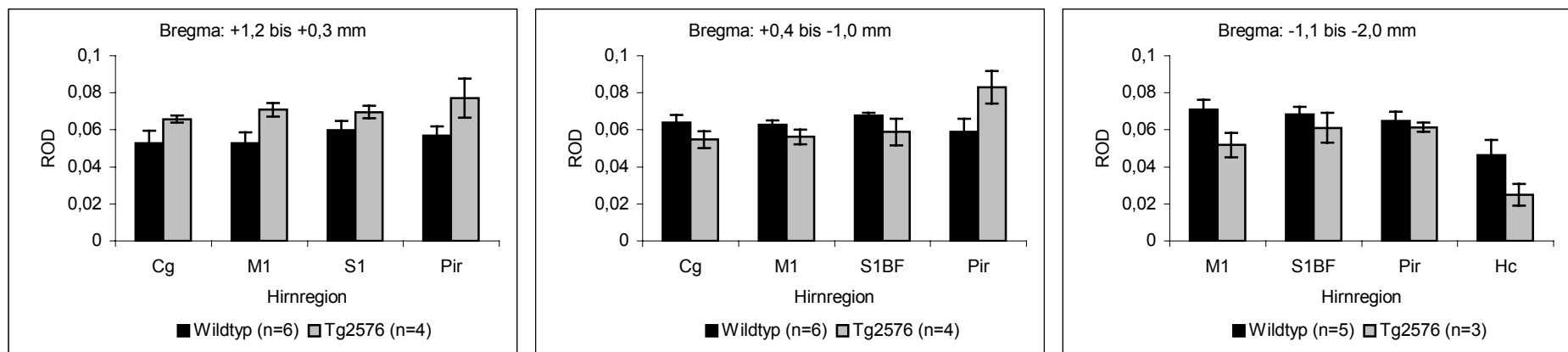


Abb. 8: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^{35}S]m $_4$ muskarinische Rezeptor mRNA-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in ROD (relative optische Dichte) \pm S $_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

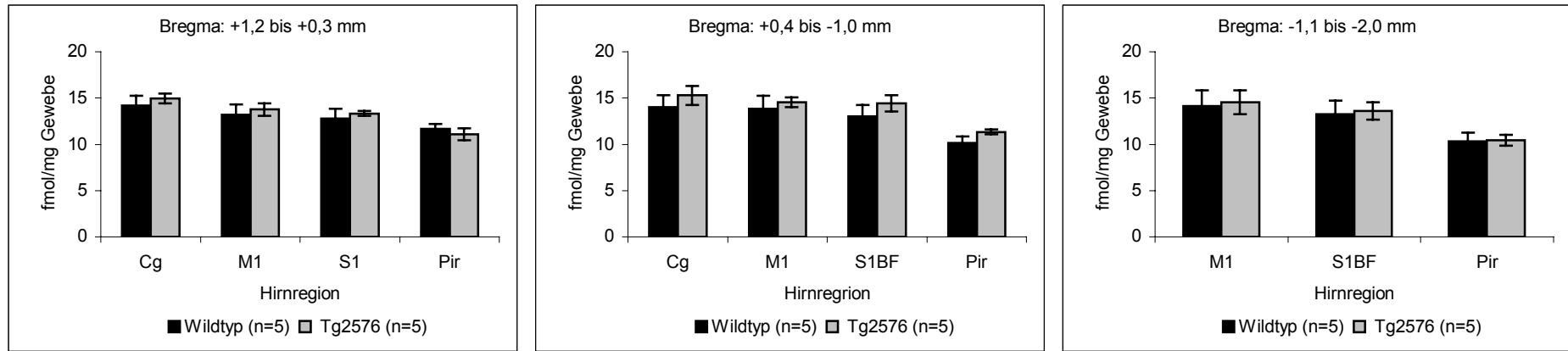


Abb. 9: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Cytisin-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 5 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in fmol/mg Gewebe $\pm S_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

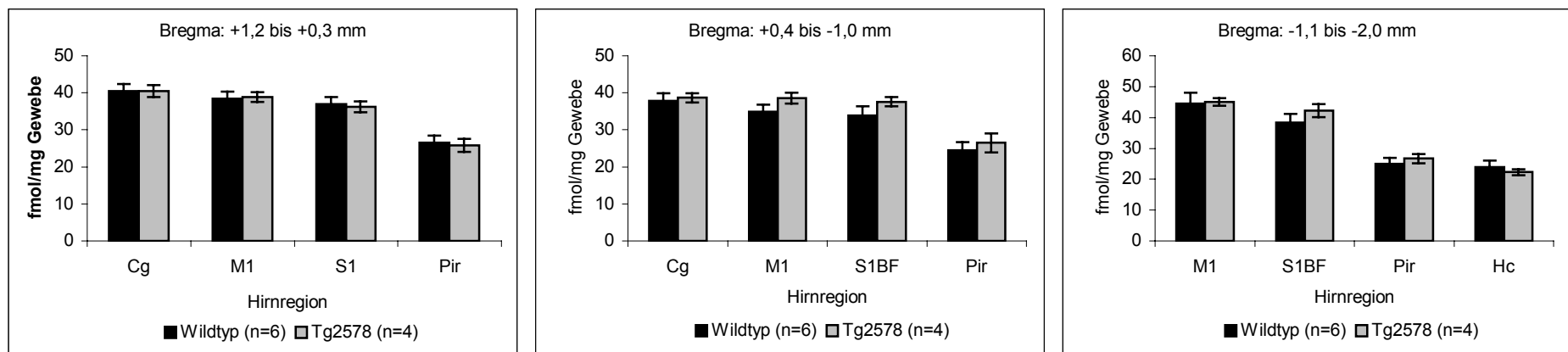


Abb. 10: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Cytisin-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in fmol/mg Gewebe $\pm S_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

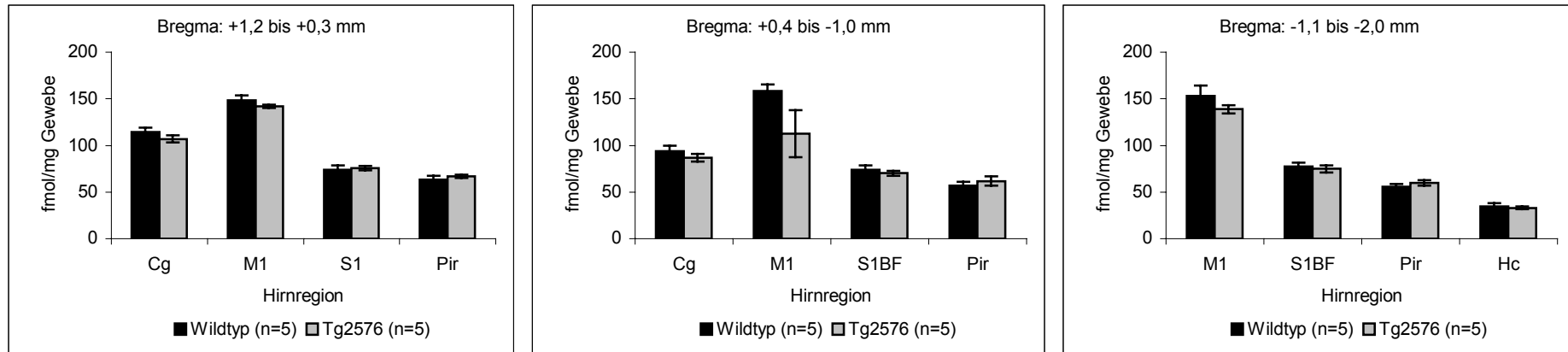


Abb. 11: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Prazosin-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 5 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in fmol/mg Gewebe $\pm S_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

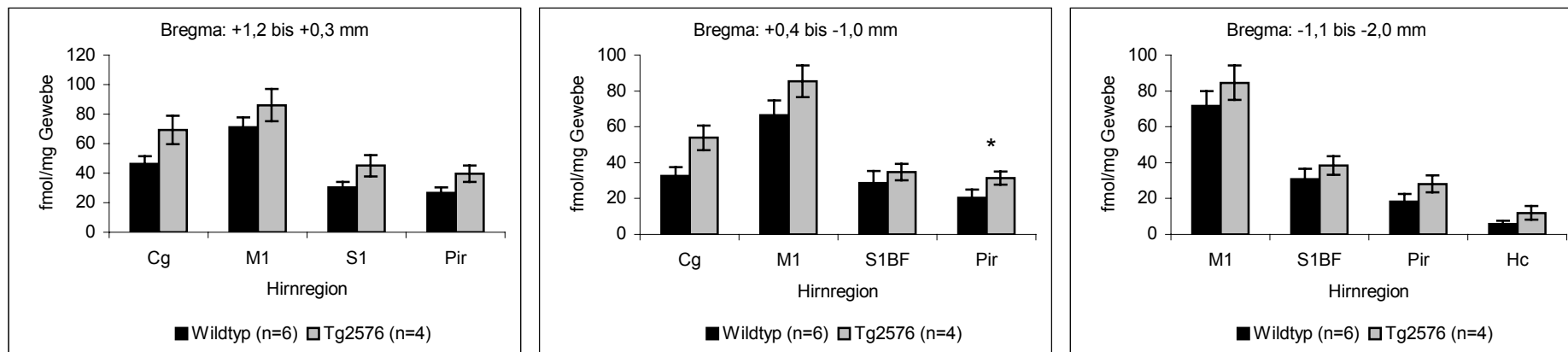


Abb. 12: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Prazosin-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in fmol/mg Gewebe $\pm S_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

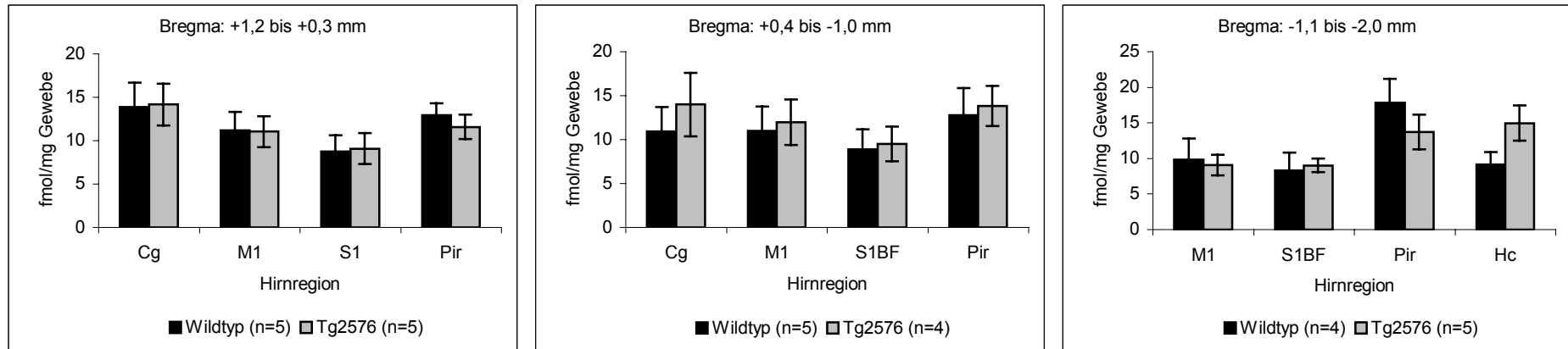


Abb. 13: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Rauwolschine-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 5 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in fmol/mg Gewebe \pm S_d. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

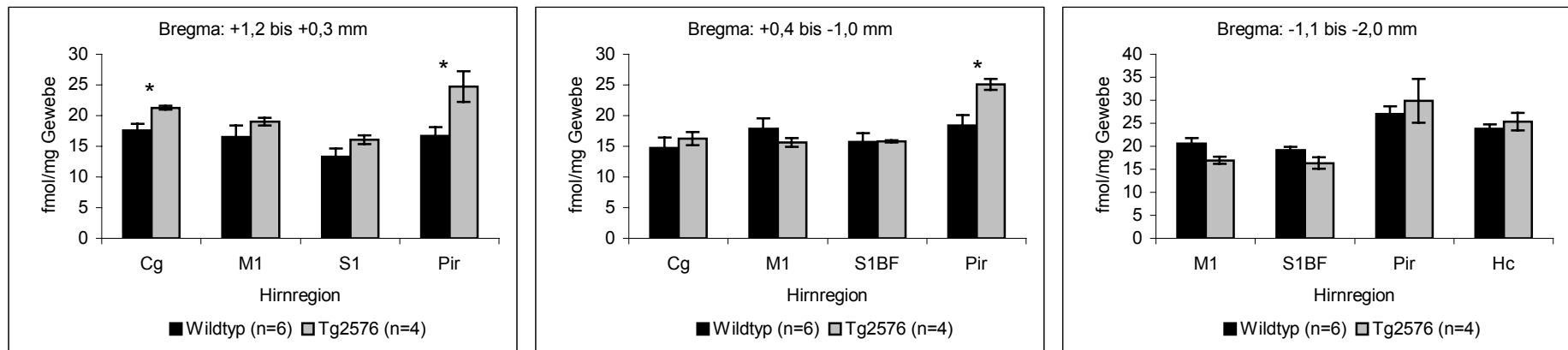


Abb. 14: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Rauwolschine-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in fmol/mg Gewebe \pm S_d. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

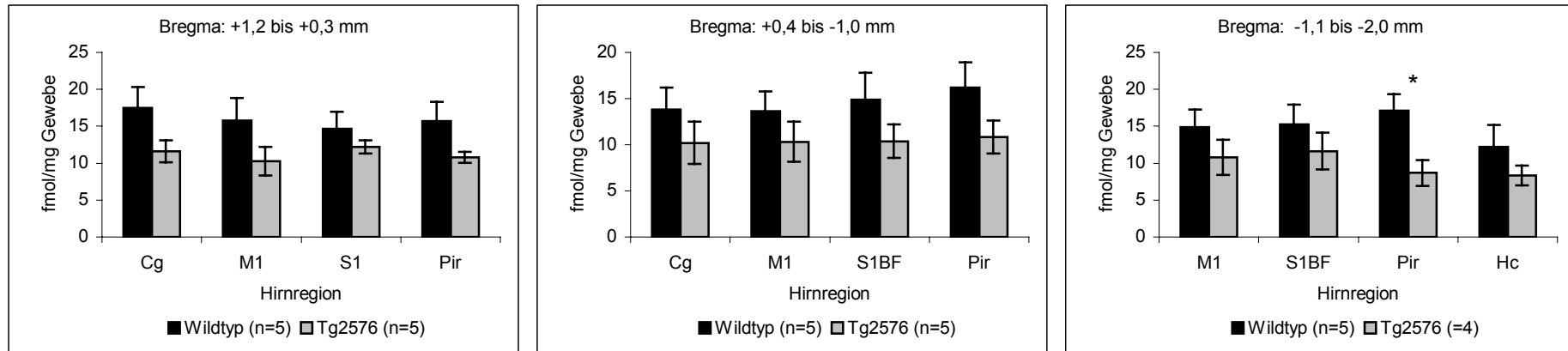


Abb. 15: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Dihydroalprenolol-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 5 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in fmol/mg Gewebe $\pm S_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

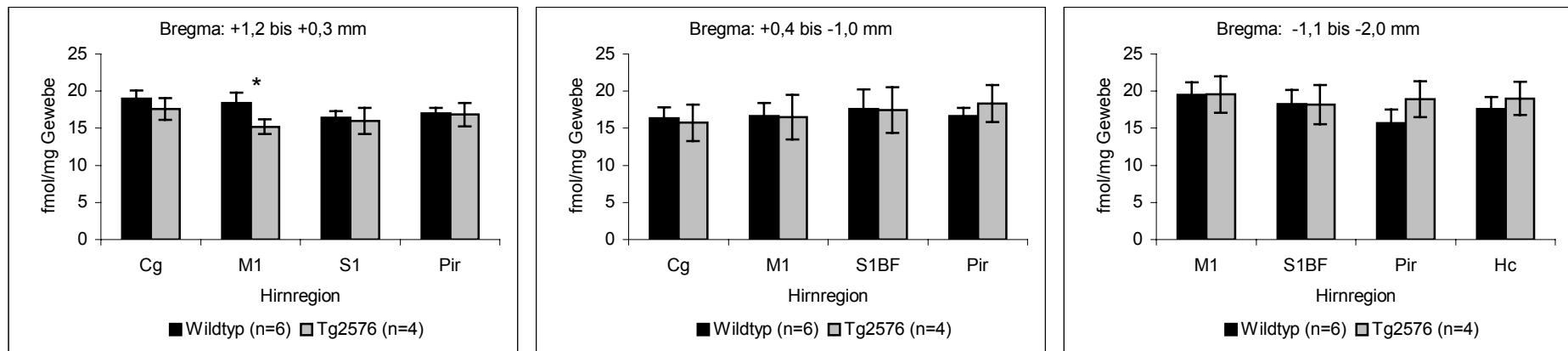


Abb. 16: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Dihydroalprenolol-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in fmol/mg Gewebe $\pm S_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

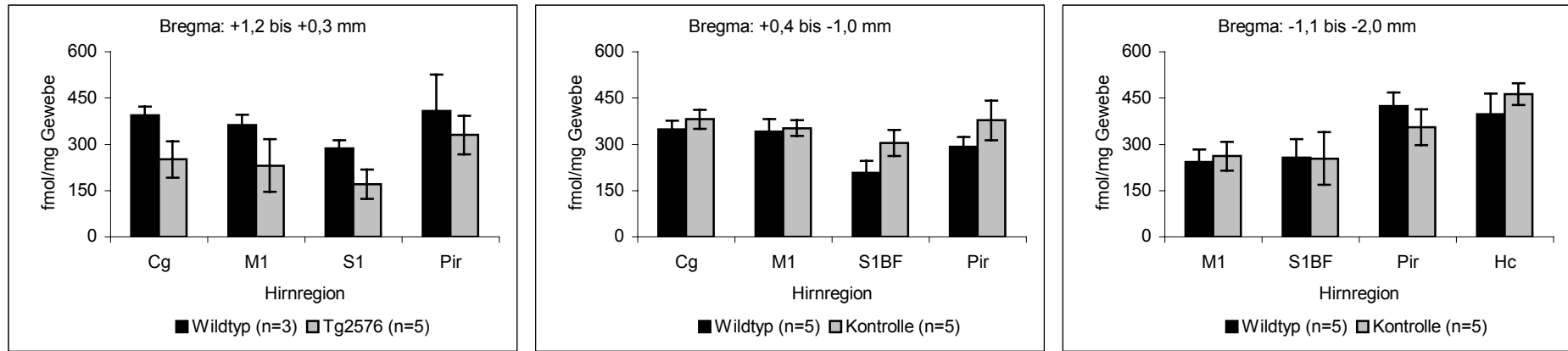


Abb. 17: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Cytochalasin-B-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 5 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in fmol/mg Gewebe $\pm S_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

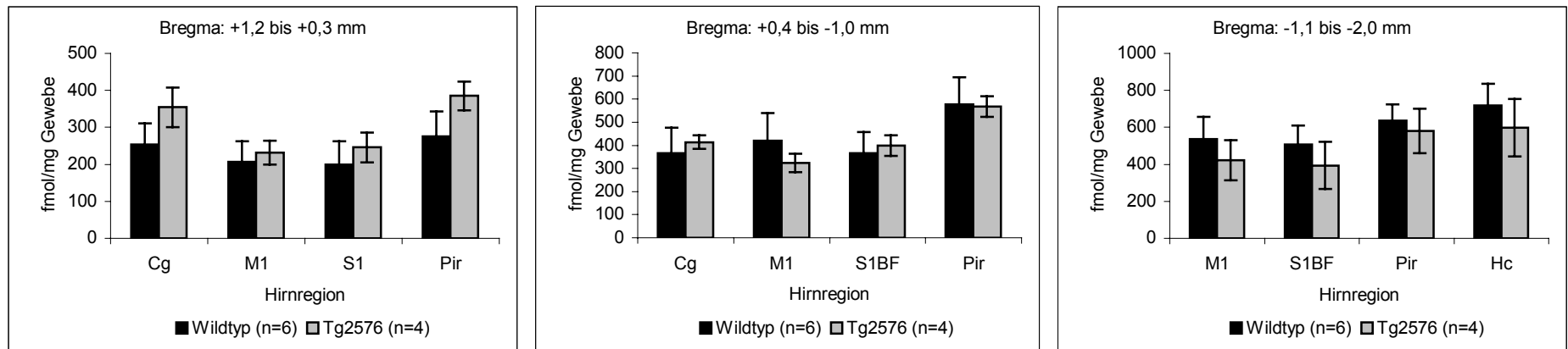


Abb. 18: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Cytochalasin-B-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in fmol/mg Gewebe $\pm S_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

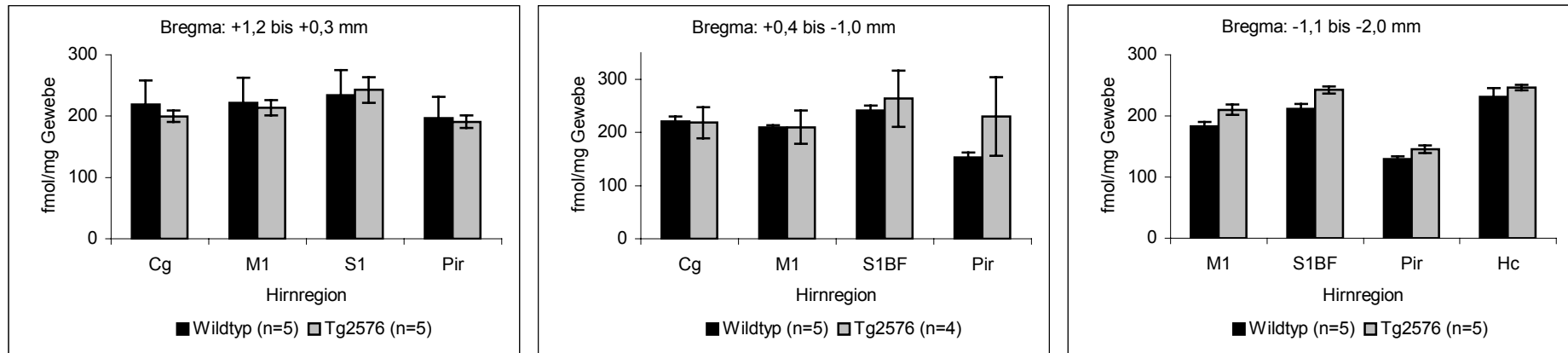


Abb. 19: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Glibenclamid-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 5 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in fmol/mg Gewebe $\pm S_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

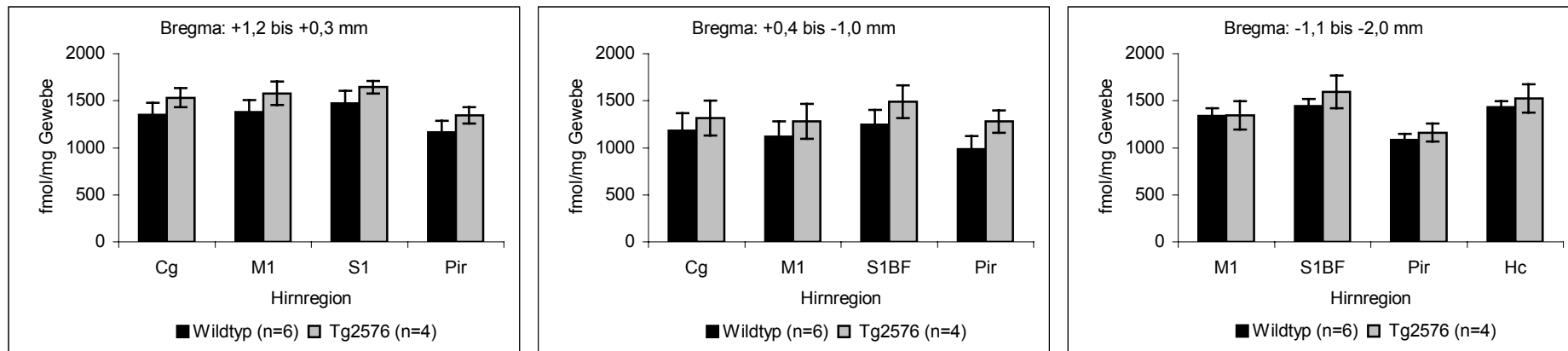


Abb. 20: Grafische Darstellung der Quantifizierung der [^3H]Glibenclamid-Bindung in ausgewählten Hirnregionen von 17 Monate alten transgenen Tieren im Vergleich zu nicht transgenen Geschwistertieren in fmol/mg Gewebe $\pm S_d$. Die angegebenen Fehler repräsentieren die Standardabweichung vom Mittelwert.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor R. Schliebs für die Überlassung des Themas sowie die gute wissenschaftliche Betreuung und seine Unterstützung in allen Phasen der Promotion.

Bei Herrn Professor V. Bigl bedanke ich mich für die Möglichkeit, diese Arbeit am Paul-Flechsig-Institut für Hirnforschung anfertigen zu können.

Herrn Professor Seeger danke ich für die gute Begleitung der Arbeit.

Weiterhin möchte ich herzlich danken:

Frau Dr. J. Apelt für die Einführung in die biochemischen Methoden, die Unterstützung bei den operativen Eingriffen und die gute Zusammenarbeit,

Herrn Dr. J. Grosche sowie Herrn Dr. M. Franke für ihre Hilfe bei der Erstellung der Bilder am konfokalen Laser-Scanning-Mikroskop,

Herrn Dr. J. Patt für die Iodierung der Pentapeptide,

Herrn Dipl.-Biochemiker T. Züchner, Herrn PD Dr. S. Roßner und Herrn Dr. T. Stahl für viele interessante Diskussionen und hilfreiche Hinweise,

Frau R. Jendrek und Frau U. Radon für die hervorragende technische Assistenz sowie ihre Geduld und

Frau Hummel für die unermüdliche Beschaffung der benötigten Literatur.

Schließlich danke ich allen Mitarbeitern des Paul-Flechsig-Instituts für Hirnforschung für ihre Hilfsbereitschaft und das außerordentlich freundliche Arbeitsklima sowie allen Angehörigen und Freunden für ihre moralische Unterstützung.

Die Arbeit wurde vom Sächsischen Staatsministerium für Wissenschaft und Kunst finanziell unterstützt.